



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

LAYANY CAROLYNY DA SILVA MOURÃO

ABORDAGEM FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS
ESPÉCIES *Manilkara zapota* (L.) P. ROYEN E *Mimusops commersonii* (G.DON)
ENGL..

PHYTOCHEMICAL APPROACH AND BIOLOGICAL-ACTIVITY EVALUATION OF
Manilkara zapota (L.) P. ROYEN AND *Mimusops commersonii* (G. DON) ENGL..

CAMPINAS

2017

LAYANY CAROLYNY DA SILVA MOURÃO

ABORDAGEM FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS
ESPÉCIES *Manilkara zapota* (L.) P. ROYEN E *Mimusops commersonii* (G.DON)
ENGL..

*PHYTOCHEMICAL APPROACH AND BIOLOGICAL-ACTIVITY EVALUATION OF
Manilkara zapota (L.) P. ROYEN AND Mimusops commersonii (G. DON) ENGL..*

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como parte
dos requisitos exigidos para a obtenção do título
de doutora em Ciências na área de Fármacos,
Medicamentos e Insumos para a Saúde.

*Thesis presented to Biology Institute of State
University of Campinas as part of the requeriments
for obtaining the PhD title in Sciences in the
Pharmaceuticals Drugs, Medicines and Supplies
for Health.*

ORIENTADORA: VERA LUCIA GARCIA

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES; FAPESP, 2013/05355-1
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1473-8861>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

M865a Mourão, Layany Carolyn da Silva, 1984-
Abordagem fitoquímica e avaliação da atividade biológica das espécies
Manilkara zapota (L.) P. Royen e *Mimusops commersonii* (G. Don) Engl. /
Layany Carolyn da Silva Mourão. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Vera Lúcia Garcia.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Biologia.

1. Química vegetal. 2. Sapoti. 3. *Mimusops*. 4. Anti-helmínticos. 5.
Atividade antimicrobiana. I. Rehder, Vera Lúcia Garcia, 1959-. II. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Phytochemical approach and biological-activity evaluation of
Manilkara zapota (L.) P. Royen and *Mimusops commersonii* (G. Don) Engl.

Palavras-chave em inglês:

Botanical chemistry

Sapodilla

Mimusops

Anthelmintics

Antimicrobial activity

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde

Titulação: Doutora em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

Banca examinadora:

Vera Lúcia Garcia [Orientador]

Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz

Carolina Borsoi Moraes Holanda de Freitas

Danilo Ciccone Miguel

Fábio Ferreira Perazzo

Data de defesa: 16-02-2017

Programa de Pós-Graduação: Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

FOLHA DE APROVAÇÃO

Campinas, 16 de fevereiro de 2017.

Vera Lúcia Garcia (CPQBA/Unicamp)_____

(Presidente da banca examinadora)

Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz (CPQBA/Unicamp)_____

Carolina Borsoi Moraes Holanda de Freitas (CNPEM)_____

Danilo Ciccone Miguel (IB/Unicamp)_____

Fabio Ferreira Perazzo (Unifesp)_____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho àqueles acometidos pelas ditas “doenças de pobre”. A esses milhões de pessoas que têm o seu direito a uma vida digna NEGLIGENCIADO a cada dia; pela pobreza, condições de moradia precárias, pela ineficácia dos serviços de saúde e principalmente pelo descaso daqueles “socialmente imunes” à essas doenças que perpetuam ao longo dos anos a ideia de que esse grave problema não é tão importante ou que de fato, ele nem se quer existe.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo apoio incondicional durante toda essa trajetória, devo tudo que sou a eles com certeza;

Aos meus irmãos Leandro e Letys por estarem sempre presentes mesmo com a distância;

Aos meus sobrinhos Rennan, Giovanna, Maria Alice e Heitor por tornarem os dias da família Mourão mais coloridos;

Ao meu noivo Jason, pelo companheirismo, pela paciência e por acreditar em mim muitas vezes, mais que eu mesma (Ahh e pela contribuição primordial sumarizando as coisas! Hahaha...Valeu Lindo!!);

Aos parceiros de tese da DQOF Sinésio, Adriana, Gabi. A amizade de vocês deu sentido a muitas coisas nessa trajetória;

Aos amigos Marili e Adilson por todas as contribuições científicas e pessoais! Depois de vocês a cromatografia adquiriu outro sentido pra mim;

À minha orientadora Vera Lúcia Garcia, por acreditar em mim e se aventurar comigo nesse trabalho e por não desistir apesar das dificuldades no caminho;

Ao meu coorientador Didier Stien por me introduzir nesse mundo da elucidação estrutural. Não sei muito mas o pouco que sei aprendi com você, muito obrigada;

Aos funcionários do CPQBA pela acolhida e por me permitirem fazer parte desse time;

Ao Rafael secretário da Pós que nesses anos resolveu todas as minhas questões sempre com um sorriso no rosto. Obrigada Rafa!!

Agradeço também ao Departamento de Biologia Animal na pessoa da Prof Silmara Allegretti pela contribuição fundamental em minha formação profissional.

Aos amigos que conquistei durante esses anos, tanto no Brasil quanto na França, obrigada por fazerem tudo valer à pena!

À CAPES e à FAPESP pelo apoio financeiro.

RESUMO

O uso de plantas para fins medicinais apresenta vantagens que tornam a sua utilização muito atrativa, principalmente em países em desenvolvimento. O desenvolvimento de compostos com ação anti-helmíntica ou antimicrobiana representa uma necessidade urgente, devido a alta prevalência de doenças infecciosas novas e reemergentes além da crescente resistência dos patógenos aos fármacos atuais. Nosso estudo teve como objetivo determinar a composição química e avaliar as atividades anti-helmíntica, antibacteriana e antifúngica de extratos, frações e compostos isolados das folhas de *Manilkara zapota* (L.) P. Royen (sapoti) e de *Mimusops commersonii* (G. Don) Engl (abricó-da-praia). Extratos etanólicos e frações iniciais das folhas de ambas as espécies foram preparados separadamente por turbulização. A purificação dos extratos para obtenção dos compostos isolados foi realizada por (1) filtração em coluna de poliamida e extração em fase sólida e (2) por cromatografia Flash seguido de separação por cromatografia preparativa. Essas etapas foram monitoradas por cromatografia em camada delgada e perfis analíticos obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência. As técnicas de cromatografia a gás acoplada a detector seletivo de massas, rotação óptica, determinação de massa de alta resolução, e ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais foram empregadas para identificação e elucidação estrutural dos compostos. A atividade anti-helmíntica contra *Strongyloides venezuelensis* foi avaliada a partir da sobrevida (%) de parasitas adultos (fêmeas partenogenéticas) expostos diretamente aos extratos, frações e compostos isolados. O teste de atividade antimicrobiana (MIC) foi realizado frente aos patógenos *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Trichophyton rubrum*. O extrato etanólico, a fração de maior polaridade, a fração enriquecida em compostos fenólicos, miricitrina e ácido clorogênico, oriundos de folhas de *M. zapota* mostraram potente ação anti-helmíntica na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$, enquanto a fração de menor polaridade apresentou ação potente antibacteriana. O extrato e as frações iniciais foram potentes frente à *C. albicans* (16 $\mu\text{g/mL}$). O composto **2** foi potente frente ao *S. aureus* e *T. rubrum* (8 e 16 $\mu\text{g/mL}$). Dos derivados de *M. commersonii*, a fração rica em compostos

fenólicos (F₂) apresentou melhor ação anti-helmíntica. O extrato etanólico e as frações iniciais apresentaram atividade promissora frente à *C. albicans* e *S. aureus*. O composto **3'** apresentou atividade antibacteriana potente e o composto **5'** foi potencialmente ativo frente à *T. rubrum* e *S. aureus*. Este é o primeiro relato sobre a identificação dos compostos ácido clorogênico, miricetina-3- glicosídeo, mearnsitrina, germanicol e seu acetato em folhas de *M. zapota* e de um norisoprenoide e quatro diferentes ácidos protobassicos em folhas de *M. commersonii*.

ABSTRACT

The use of plant extracts has several advantages that make them attractive for developing countries. The development of new compounds with antimicrobial or anthelmintic properties is even more urgent due to an increase in the prevalence of new and reemerging infectious diseases, besides a growing resistance to current drugs. The purpose of this study was to determine the chemical composition of the leaves of *Manilkara zapota* (L.) P. Royen (sapoti) and *Mimusops commersonii* (G. Don) Engl. (abricó-da-praia) and to evaluate the antimicrobial and anthelmintic activities of their ethanolic extracts, fractions and isolated compounds. Ethanolic extracts, primary fractions of sapoti and abricó-da-praia leaves were prepared separately via ultra-turrax extraction. The purification of fractions to obtain the isolated compounds was performed through (i) filtration in polyamide column followed by solid phase extraction and preparative chromatography ; (ii) and flash chromatography followed by preparative separation. These steps were monitored by TLC and high performance liquid chromatography profiles. Gas chromatography coupled to mass spectrometry, optical rotation, high resolution mass, and ^1H and ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance spectroscopic (1D and 2D) were used for identification and structural elucidation. The anthelmintic action against *Strongyloides venezuelensis* was evaluated by means of the survival rate of the adult parasites (parthenogenetic females) that were directly exposed to the extracts, fractions and isolated compounds. Antimicrobial assays (MIC) were performed against to *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Trichophyton rubrum*. The ethanolic extract, higher polarity fraction, myricitrin and chlorogenic acid from *M. zapota* leaves showed potential anthelmintic activity while the lower polarity fraction showed potential antibacterial action. The extract and primary fractions showed potential activity against to *C. albicans* (16 $\mu\text{g/mL}$). The compound **2**, was active against to *S. aureus* and *T. rubrum* (8 and 16 $\mu\text{g/mL}$). For *M. commersonii* the fraction rich in phenolic compounds presented the best anthelmintic action. The ethanolic extract and initial fractions was active against *S. aureus* and *C. albicans*. For derived of *M. commersonii* the fraction of phenolic compounds (F₂) showed the best anthelmintic activity. The ethanolic extract and primary fractions have promising action against to *C. albicans* and *S. aureus*. The compound **3'** showed potential antibacterial activity while the compound

5' was active against *T. rubrum* and *S. aureus*. This is the first report into the identification of chlorogenic acid, myricetin-3-glucoside, mearnsitrin, germanicol and germanicol acetate in *M. zapota* leaves and of an isoprenoid and four protobassic acids in *M. commersonii* leaves.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Diversidade estrutural de metabólitos secundários das plantas.	28
Figura 2: <i>Manilkara zapota</i> (L.) P. Royen e detalhes das folhas e frutos.	30
Figura 3: <i>Mimusops commersonii</i> (G. Don) Engl e detalhes das folhas e frutos.	32
Figura 4: Prevalência da infecção por <i>S. stercoralis</i> a partir de dados dos serviços de saúde.	38
Figura 5: Duplo ciclo evolutivo do <i>S. Stercoralis</i> com fases heterogônica e parasítica.	39
Figura 6: Fluxograma de obtenção de extratos e frações primárias de <i>M. zapota</i> e <i>M. commersonii</i> por turbolização.	46
Figura 7: Fluxograma de obtenção de extratos de <i>M. zapota</i> e <i>M. commersonii</i> por extração em soxhlet.	47
Figura 8: Etapas para obtenção dos compostos isolados de <i>M. zapota</i> e <i>M. commersonii</i> considerando a massa inicial da fração de maior polaridade.	49
Figura 9: Cromatogramas referentes ao fracionamento do extrato etanólico de <i>M. zapota</i>	61
Figura 10: Cromatogramas referentes às frações obtidas por cromatografia Flash (F ₁ , F ₂ , F ₃ , F ₄ e F ₅) das folhas de <i>M. zapota</i> (FMaP).	62
Figura 11: Cromatograma do EEMz com os picos correspondentes aos compostos identificados na FMaPMz.	63
Figura 12: Estrutura do composto 1 isolado de <i>M. zapota</i>	63
Figura 13: Esqueleto básico dos compostos 2 , 3 e 4 isolados de <i>M. zapota</i>	64
Figura 14: Estrutura do composto 2 isolado de <i>M. zapota</i>	66

Figura 15: Estrutura do composto 3 isolado de <i>M. zapota</i>	66
Figura 16: Chave de correlação HMBC para o composto 4 isolado de <i>M. zapota</i>	67
Figura 17: Cromatograma (CG-EM) expandido (28 a 52 min) da fração de menor polaridade das folhas de <i>M. zapota</i>	68
Figura 18: Proposta de fragmentação de compostos da série olean-12-eno via reação Retro-Diels-Alder (RDA).	69
Figura 19: Proposta de fragmentação de compostos da série ursan-12-eno via reação Retro-Diels-Alder (RDA).	69
Figura 20: Estrutura química dos compostos detectados por CG-EM na fração de menor polaridade de folhas de <i>M. zapota</i>	71
Figura 21: Atividade anti-helmíntica do extrato e fração inicial de folhas <i>M. zapota</i> frente ao <i>S. venezuelensis</i> em função do tempo de incubação.	73
Figura 22: Atividade anti-helmíntica das frações de folhas de <i>M. zapota</i> frente ao <i>S. venezuelensis</i> em função do tempo de incubação.....	74
Figura 23: Atividade anti-helmíntica dos compostos isolados de folhas de <i>M. zapota</i> frente ao <i>S. venezuelensis</i> em função do tempo de incubação.	75
Figura 24: Comparação da atividade anti-helmíntica do extrato, frações e compostos isolados de folhas de <i>M. zapota</i> nas concentrações intermediárias do estudo em função do tempo de incubação.	76
Figura 25: Fêmeas partenogenéticas de <i>S. venezuelensis</i> a 400 µg/mL e 72 horas de incubação.....	77
Figura 26: Cromatogramas referentes ao fracionamento do extrato etanólico de <i>M. commersonii</i>	87

Figura 27: Cromatogramas referentes às frações obtidas por cromatografia Flash (F ₂ , F ₄ e F ₅) das folhas de <i>M. commersonii</i> (FMaP).....	88
Figura 28: Perfis analíticos por HPLC dos compostos isolados (1', 2', 3', 4' e 5') da fração de maior polaridade da <i>M. commersonii</i> comparados à fração original FMaPMc.	89
Figura 29: Estrutura do composto 1' isolado de <i>M. commersonii</i>	91
Figura 30: Aglicona identificada para os compostos 2', 3', 4' e 5' isolados de <i>M. commersonii</i>	92
Figura 31: Estrutura do composto 2' isolado de <i>M. commersonii</i>	96
Figura 32: Estrutura do composto 3' isolado de <i>M. commersonii</i>	98
Figura 33: Estrutura do composto 4' isolado de <i>M. commersonii</i>	99
Figura 34: Estrutura do composto 5' isolado de <i>M. commersonii</i>	101
Figura 35: Cromatograma expandido (30 a 50 min) da fração de menor polaridade das folhas de <i>M. commersonii</i> (FMePMc).....	102
Figura 36: Estrutura química dos compostos detectados por CG-EM na fração de menor polaridade de folhas de <i>M. commersonii</i>	105
Figura 37: Atividade anti-helmíntica do extrato e fração inicial das folhas de <i>M. commersonii</i> frente ao <i>S. venezuelensis</i> em função do tempo de incubação.	106
Figura 38: Atividade anti-helmíntica da fração <i>M. commersonii</i> frente ao <i>S. venezuelensis</i> em função do tempo de incubação.....	107
Figura 39: Comparação da atividade anti-helmíntica de extrato, frações e compostos de folhas de <i>M. zapota</i> nas concentrações intermediárias do estudo.	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Esquema de solventes empregado na Extração em Fase Sólida (SPE).	48
Tabela 2: Microrganismos testados no estudo.....	57
Tabela 3: Características dos extratos e frações obtidos no processo de fracionamento e purificação das folhas de <i>M. zapota</i>	60
Tabela 4: Análise CG-EM da composição química da fração de menor polaridade de folhas de <i>M. zapota</i>	70
Tabela 5: Concentração Inibitória Mínima (MIC) de extratos, frações iniciais e flavonoides isolados das folhas de <i>M. zapota</i>	81
Tabela 6: Características dos extratos e frações obtidos no processo de fracionamento e purificação das folhas de <i>M. commersonii</i>	86
Tabela 7: Dados de RMN (^1H e ^{13}C) para a porção sacarídica C-3 das saponinas 2' , 3' , 4' e 5' (CD_3OD 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C).....	94
Tabela 8: Dados de RMN para as porções oligossacarídicas em C-28 para as saponinas 2' , 3' , 4' e 5' (CD_3OD 500 para ^1H e 125 MHz para ^{13}C).	97
Tabela 9: Análise CG-EM da composição química da fração de menor polaridade de folhas de <i>M. commersonii</i>	103
Tabela 10: Concentração Inibitória Mínima (MIC) de extratos, frações iniciais e saponinas isoladas de <i>M. commersonii</i>	110

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CAD	<i>Charged Aerosol Detector</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCD	Cromatografia em camada delgada
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CG-EM	Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia Líquida de alta eficiência
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CNRS	<i>Centre National de la Recherche Scientifique</i>
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
DAD	Detector de arranjo de diodos
DALY	<i>Disability-Adjusted Life Year</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTN	Doenças Tropicais Negligenciadas
EEMc	Extrato etanólico de <i>Mimusops commersonii</i>
EEMz	Extrato etanólico de <i>Manilkara zapota</i>
EHxAcMc	Extrato obtido em Hexano: Acetato de <i>Manilkara zapota</i>
EHxAcMz	Extrato obtido em Hexano: Acetato de <i>Manilkara zapota</i>
ELSD	Evaporative light scattering detector
ESI	Electrospray interface
FMaP	Fração de Maior Polaridade
FMaPMc	Fração de Maior Polaridade de <i>Mimusops commersonii</i>
FMaPMz	Fração de Maior Polaridade de <i>Manilkara zapota</i>
FMeP	Fração de Menor Polaridade
FMePMc	Fração de Menor Polaridade de <i>Mimusops commersonii</i>
FMePMz	Fração de Menor Polaridade de <i>Manilkara zapota</i>
HaCaT	Linhagem celular de queratinócito humano :

HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HR	<i>High resolution</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
HTS	Helminthíases transmitidas pelo solo
IB	Instituto de Biologia
ICSN	<i>Institut de Chimie des Substances Naturelles</i>
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
J	Constante de acoplamento
µg/mL	microgramas por mililitro
m/z	relação massa carga
Mc	<i>Mimusops commersonii</i>
MHz	Mega Hertz
MIC	Concentração Inibitória Mínima
min	minutos
MS	<i>Mass spectrometer</i>
Mz	<i>Manilkara zapota</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCE	Novas entidades químicas
nm	nanômetros
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (solução salina tamponada)
ppm	partes por milhão
PVP	Polivinilpirrolidona
RDA	reação de Retro-Diels–Alder
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute (meio de cultura – série 1640)
SPE	<i>Solid phase extraction</i>
TGI	<i>Total Growth Inhibition</i>
TLC	Thin-layer chromatography

TMS	tetrametilsilano
TOF	Time-of-flight
T_R	Tempo de retenção
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UPLC	<i>Ultra performance liquid chromatography</i>
UV	Ultravioleta
v/v	volume/volume
WHO	World Health Organization
δ	deslocamento químico

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	22
OBJETIVOS.....	24
Objetivo geral	24
Objetivos específicos	24
CAPÍTULO 1	26
REVISÃO DE LITERATURA	27
1. A utilização de plantas e produtos naturais na terapêutica	27
2. Espécies empregadas no estudo	29
2.1. <i>Manilkara zapota</i> (L.) P. Royen.....	29
2.2. <i>Mimusops commersonii</i> (G. Don) Engl.....	31
3. Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs).....	33
4. Estrongiloidíase.....	36
5. Infecções microbianas	41
CAPÍTULO 2	44
MATERIAL E MÉTODOS	45
1. Coleta e identificação do material vegetal.....	45
2. Obtenção dos extratos, frações e compostos isolados de <i>M. zapota</i> e <i>M. commersonii</i>	45
2.1. <i>Extração e fracionamento inicial</i>	45
2.2. <i>Fracionamento e purificação</i>	48
2.2.1. Cromatografia de adsorção em coluna de poliamida	48
2.2.2. Extração em fase sólida (SPE)	48
2.2.3. Cromatografia em Sistema Flash.....	48
2.2.4. Cromatografia Líquida Preparativa	49
3. Análise química de extratos, frações e compostos isolados de <i>M. zapota</i> e <i>M. commersonii</i>	50
3.1. <i>Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)</i>	50

3.2.	<i>Cromatografia em camada delgada (CCD)</i>	50
3.3.	<i>Cromatografia em fase gasosa acoplada ao detector de massas (CG-EM)</i>	51
3.4.	<i>Análises por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a detector de massa de alta resolução (UPLC-HRESITOFMS)</i>	51
3.5.	<i>Determinação do poder rotatório</i>	52
3.6.	<i>Identificação estrutural das moléculas por Ressonância Magnética Nuclear</i> ...	52
3.6.1.	Compostos isolados de <i>M. zapota</i>	52
3.6.2.	Compostos isolados de <i>M. commersonii</i>	54
4.	Testes biológicos com as espécies <i>M. zapota</i> e <i>M. commersonii</i>	55
4.1.	<i>Avaliação da atividade anti-helmíntica in vitro contra Strongyloides venezuelensis</i>	55
4.1.1.	Parasitas e animais	55
4.1.2.	Teste de atividade anti-helmíntica <i>in vitro</i>	56
4.1.3.	Análises estatísticas	56
4.1.4.	Observação de alterações morfológicas	56
4.2.	<i>Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro</i>	56
4.2.1.	Microrganismos	57
4.2.2.	Preparo do inóculo.....	57
4.2.3.	Avaliação da atividade antimicrobiana por meio do teste de microdiluição	57
4.3.	<i>Atividade antiproliferativa in vitro de extratos frações e compostos isolados de M. zapota e M. commersonii sobre queratinócitos humanos (HaCaT)</i>	58
CAPÍTULO 3		59
RESULTADOS E DISCUSSÃO REFERENTES À ESPÉCIE <i>Manilkara zapota</i> (L.) P. Royen		60
1.	Obtenção dos extratos e frações	60
2.	Análise e elucidação estrutural dos compostos isolados da fração de maior polaridade (FMePMz)	62
3.	Avaliação da composição químicas da FMePMz por CG-EM.....	68
4.	Testes de atividade anti-helmíntica in vitro frente ao <i>S. venezuelensis</i>	72

5. Efeito de extratos, frações e isolados de <i>M. zapota</i> sobre queratinócitos humanos (HaCaT).....	80
6. Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	80
7. Conclusão	83
CAPÍTULO 4	85
RESULTADOS E DISCUSSÃO REFERENTES À ESPÉCIE <i>Mimusops commersonii</i>	
(G. Don) Engl.	86
1. Obtenção de extratos e frações	86
2. Análise e elucidação estrutural dos compostos isolados da fração de maior polaridade (FMaPMc).....	89
3. Avaliação da composição química da FMePMc por CG-EM.....	101
4. Testes de atividade anti-helmíntica <i>in vitro</i> frente ao <i>S. venezuelensis</i>	105
5. Efeito de extratos, frações e isolados de <i>M. commersonii</i> sobre queratinócitos humanos (HaCaT).....	109
6. Avaliação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	110
7. Conclusão	112
CONSIDERAÇÕES FINAIS	114
REFERÊNCIAS.....	116
ANEXOS	135

INTRODUÇÃO

As plantas são utilizadas para fins medicinais desde o início dos tempos e suas propriedades de cura advêm dos compostos químicos que elas sintetizam. A diversidade química dos vegetais é produto da sua interação com o ambiente, e tal fato faz das espécies vegetais uma fonte riquíssima de moléculas biologicamente ativas.

Diante das limitações dos compostos adotados na terapêutica convencional (alto custo, toxicidade, desenvolvimento de resistência) a busca por novos agentes terapêuticos de origem natural se apresenta como uma alternativa muito promissora. Um trabalho realizado por Bastos (2011) visando a busca de plantas com potencial atividade anti-helmíntica revelou que de 25 espécies de frutíferas cultivadas no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP), os extratos brutos das sapotáceas *Manilkara zapota* e *Mimusops commersonii*, apresentaram resultados interessantes.

Nesse contexto, este projeto teve o intuito de realizar estudos de atividade anti-helmíntica *in vitro* dos extratos, frações e compostos isolados das duas plantas frente ao *Strongyloides venezuelensis*, além de determinar a composição química das folhas de *Manilkara zapota* e *Mimusops commersonii*, de modo a identificar os possíveis compostos responsáveis pela atividade antiparasitária. Adicionalmente foram realizados estudos das atividades antibacteriana e antifúngica de modo a acrescentar novas informações sobre a ação biológica dessas duas espécies presentes na flora brasileira ainda pouco exploradas.

Para desenvolvimento desse estudo contamos com a colaboração de vários laboratórios:

- ❖ A extração e o fracionamento do material vegetal foram realizados na Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica, no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP);
- ❖ A purificação das frações foi realizada no Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologies Microbiennes (LBBM) du Observatoire Océanologique de Banyuls-sur-mer, França, sob a orientação do Dr. Didier Stien.

- ❖ A elucidação estrutural e os testes de atividade antimicrobiana foram feitos no Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN-CNRS), Gif-sur-Yvette, França, sob a orientação do Dr. Didier Stien.
- ❖ Os estudos de atividade anti-helmíntica *in vitro* foram realizados no Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia (IB/ UNICAMP).
- ❖ Os testes de ação antiproliferativa frente à queratinócitos humanos foram realizados na Divisão de Farmacologia do CPQBA/ UNICAMP.

Para melhor compreensão dos temas aqui discutidos, o trabalho será apresentado em 4 capítulos, assim distribuídos:

- ❖ O capítulo 1 apresenta a revisão de literatura sobre a contextualização dos produtos naturais, as principais características das espécies vegetais utilizadas e os aspectos relacionados às enfermidades estudadas;
- ❖ O capítulo 2 contempla o material e os métodos empregados nos estudos fitoquímicos e ensaios biológicos das duas espécies estudadas;
- ❖ O capítulo 3 apresenta os resultados, discussões e conclusão referentes à espécie *Manilkara zapota*;
- ❖ Capítulo 4 contempla os resultados, discussão e conclusão referentes à espécie *Mimusops commersonii*.

As considerações finais abordam de uma forma geral, os aspectos mais relevantes obtidos no estudo de ambas as espécies.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Realizar o fracionamento, isolamento, identificação e caracterização química dos compostos presentes nos extratos etanólicos das folhas de *Manilkara zapota* (L.) P. Royen e *Mimusops commersonii* G. Don Engl. e avaliar as propriedades anti-helmíntica e antimicrobiana de extratos, frações e compostos isolados das duas espécies estudadas visando esclarecer suas propriedades medicinais, além de vislumbrar a descoberta de novos agentes terapêuticos frente às enfermidades reportadas em nosso estudo.

Objetivos específicos

- ❖ Preparar os extratos das folhas de *M. zapota* e *M. commersonii*;
- ❖ Realizar o fracionamento dos extratos obtidos, por diferentes técnicas tais como extração em fase sólida e cromatografia preparativa;
- ❖ Aperfeiçoar a separação dos compostos presentes nos extratos por meio de técnicas cromatográficas (Cromatografia Flash), visando obter maior massa de compostos isolados com alta pureza e monitorar as etapas de fracionamento, isolamento e purificação dos compostos por meio de cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).
- ❖ Identificar os compostos presentes nas frações de menor polaridade por cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de massas (CG-EM) e nas frações de maior polaridade por análises de massa de alta resolução (UPLC-ESITOFMS) e rotação óptica;
- ❖ Identificar as estruturas dos compostos isolados por meio de técnicas de RMN unidimensional, ^1H e ^{13}C , aliadas a experimentos de correlação bidimensional homonuclear ($^1\text{H} - ^1\text{H}$) COSY (COrrrelation Spectroscopy) e heteronuclear ($^1\text{H} - ^{13}\text{C}$) HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) e HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation);
- ❖ Avaliar a atividade anti-helmíntica de extratos, frações e compostos isolados frente ao *Strongyloides venezuelensis* por meio de testes *in vitro*;
- ❖ Avaliar a ação antimicrobiana das duas espécies vegetais contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Tricophyton rubrum* e *Candida albicans*;

- ❖ Avaliar por meio de testes *in vitro* a segurança da utilização das espécies *M. zapota* e *M. commersonii* por meio de testes de atividade antiproliferativa sobre a linhagem celular HaCaT (queratinócitos humanos).

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1. A utilização de plantas e produtos naturais na terapêutica

As plantas têm sido utilizadas para fins medicinais desde o início dos tempos. Os primeiros indícios do uso de plantas medicinais foram descobertos em 1960 em um sítio arqueológico numa caverna no norte do Iraque, eles datam de cerca de 60.000 anos. A análise de solo em torno de ossos humanos em uma sepultura Neanderthal revelou quantidades extraordinárias de pólen de oito espécies vegetais, dentre elas *Centaurea cianus*, *Achillea millefolium* e *Alcea* sp., plantas conhecidas por suas propriedades medicinais (SOLECKI, 1975).

Os primeiros registros escritos do uso de plantas medicinais remontam a época dos sumérios na Mesopotâmia, por volta de 4.000 a.C. Várias espécies bem conhecidas foram mencionadas em tábuas de argila, tais como alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*), mirra (*Commiphora* sp.), e papoula (*Papaver somniferum*) espécies com propriedades medicinais conhecidas referenciadas em farmacopeias (CHIN et al., 2006).

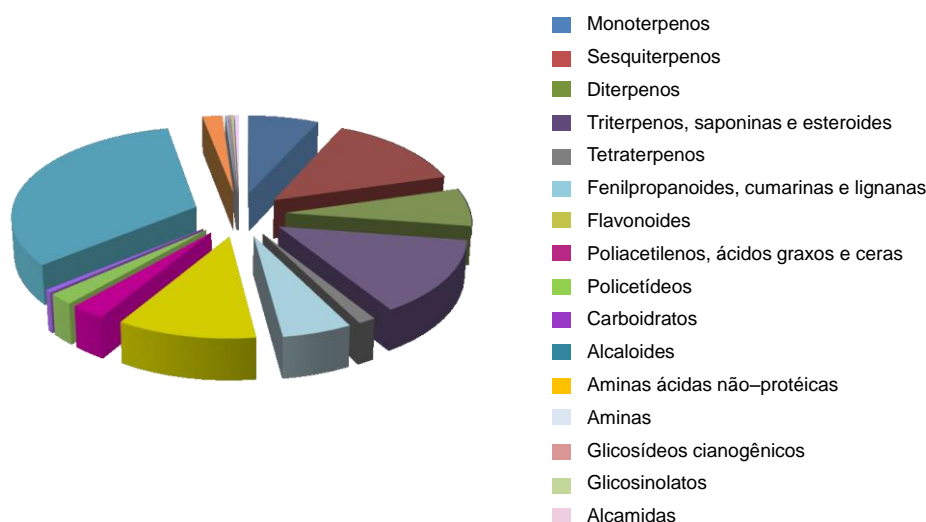
Foram datados vestígios de plantas medicinais nas civilizações antigas chinesa, indiana, asteca e egípcia. O tratado médico chinês mais antigo ("Tratado sobre plantas medicinais do imperador Shen Nung") foi escrito por volta de 2900 a.C.. Este livro menciona 365 remédios baseados em plantas (SHOU-ZHONG 2007 apud KHOURY, 2015).

Em 1806 o aprendiz farmacêutico de 21 anos chamado Friedrich Sertürner isolou o primeiro composto puro farmacologicamente ativo a partir de uma planta: a morfina do ópio, produzido pelas cápsulas de papoula, *Papaver somniferum* (HAMILTON; BASKET, 2000; HARTMANN, 2007). Até essa época, as plantas medicinais eram utilizadas em suas formas brutas tais como chás, xaropes, pomadas, unguentos, linimentos e pós. Este trabalho marcou o início de uma era na qual, substâncias advindas de plantas poderiam ser purificadas, estudadas e então administradas em doses precisas (SAMUELSSON, 2004).

A rica diversidade química das plantas resulta do processo evolutivo no qual, sucessivas interações com fatores bióticos e abióticos induzem a formação de novas estruturas químicas capazes de proporcionar a elas vantagens adaptativas. É esse lento processo interativo que leva à grande variedade de estruturas complexas

e oferecida pelos vegetais (Figura 1). Assim, as suas propriedades medicinais são decorrentes dos produtos químicos por elas sintetizados (HARTMANN, 2007).

Figura 1: Diversidade estrutural de metabólitos secundários das plantas.



Adaptado de (KHOURY, 2015; WINK, 2003).

Metabólitos secundários de plantas (MSPs) ou produtos naturais são derivados dos metabólitos primários e possuem diversas atividades fisiológicas. Esses MSPs desempenham um papel vital na forte interação entre as plantas e o ambiente garantindo, em longo prazo, a sua sobrevivência o que os torna tão essenciais quanto os metabólitos primários (VERMA; SHUKLA, 2015). Existem mais de 200.000 metabólitos secundários conhecidos em plantas, o que provavelmente representa apenas uma pequena porcentagem do número real de compostos. (HARTMANN, 2007).

Nas últimas décadas o desenvolvimento de novas tecnologias tem promovido o ressurgimento da pesquisa de produtos naturais. A automação de testes biológicos permite avaliar um maior número de extratos, frações ou compostos puros possibilitando, por exemplo, a descoberta de moléculas ativas por microfracionamento. Em adição, a evolução das técnicas analíticas acelera o isolamento e caracterização de novos compostos ativos. A aplicação destas tecnologias pode compensar as limitações inerentes aos produtos naturais e relançá-los como uma fonte importante para a descoberta de medicamentos (LITTLETON, ROGERS, FALCONE, 2005; POTTERAT, 2006).

Cragg e Newman (2013) analisaram as fontes de novos fármacos no período de janeiro de 1981 a dezembro de 2010 e concluíram que de 1073 novas entidades químicas (NCEs) apenas 36% podem ser classificadas como verdadeiramente sintéticas, assim 64% apresentam alguma inspiração natural tal como a presença de grupo farmacofórico de origem natural ou ainda têm como modelo um produto natural inibidor do alvo molecular de interesse, ou imitam o substrato endógeno do local de ação.

De fato, 19 medicamentos à base de produtos naturais foram aprovados para comercialização no mundo entre 2005 e 2010, dos quais 7 são classificados como produtos naturais, 10 como produtos naturais semi-sintéticos e 2 como medicamentos de inspiração natural (MISHRA, TIWARI, 2011). Estes medicamentos são aplicados em várias áreas terapêuticas, tais como a oncologia, doenças infecciosas de origem bacteriana, fúngica e parasitária, doenças cardiovasculares e tratamentos da dor.

Os dados mais recentes obtidos por Newman e Cragg (2016) a partir da análise das fontes de medicamentos entre os anos de 1981 e 2014 comprovaram mais uma vez, que os produtos naturais continuam desempenhando um papel dominante na descoberta de pistas para o desenvolvimento de fármacos empregados no tratamento de doenças humanas, com destaque para 174 novas entidades químicas (NCE) anticâncer das quais 83% são de inspiração natural. Esse mesmo estudo permitiu observar que antiparasitários, antibacterianos e antifúngicos hoje contam com 15, 141 e 32 fármacos de ação comprovada, respectivamente.

Assim necessidade urgente de novos fármacos para o tratamento de afecções tais como câncer, HIV e muitas outras doenças, exige uma exploração vigorosa de todas as abordagens na descoberta de fármacos (CRAGG; NEWMAN, 2013). É claro que a natureza, a qual tem sido uma fonte riquíssima de componentes que auxiliam na cura de enfermidades desde os tempos mais remotos continuará a desempenhar um papel vital nesse processo.

2. Espécies empregadas no estudo

2.1. *Manilkara zapota* (L.) P. Royen

Manilkara zapota (L.) P. Royen (Sinônimos: *M. zapotilla*, *M. achras*, *Mimusops manilkara*, *Achras zapota*, *A. sapota*) comumente conhecida no Brasil como sapoti, é uma espécie pertencente à família Sapotaceae (QUATTROCCHI,

2000; THE PLANT LIST, 2013; TROPICOS.ORG, 2016) (Figura 2). Essa família é formada por 35 a 75 gêneros ainda mal definidos e cerca de 800 espécies de árvores tropicais.

Figura 2: *Manilkara zapota* (L.) P. Royen e detalhes das folhas e frutos.



Fonte: Pomar do CPQBA (Foto: Layany Mourão).

O sapotizeiro é uma espécie frutífera originária das regiões quentes e úmidas da América Tropical, que vão do Sul do México às Américas Central e do Sul (Venezuela e Colômbia). Segundo Fouqué, (1972 apud SILVA JÚNIOR 2014) acredita-se que a região de Yucatán, norte de Belize e nordeste da Guatemala seja o seu verdadeiro centro de origem. Essa planta tem ocorrência em solos bem drenados, florestas tropicais e subtropicais e planícies ao longo da costa do Golfo e do Pacífico (PENNINGTON; J. SARUKHA'N, 1998). É uma planta exótica que se adaptou muito bem ao Brasil, principalmente na região nordeste do país (MORAIS et al., 2008).

Essa planta tem crescimento lento e perene podendo atingir uma altura de 12 a 18 metros. Os frutos têm polpa de cor castanha, com cinco sementes, quando maduros têm forma redonda ou fusiforme, 5-10 cm de diâmetro, são comestíveis, embora granulados, e têm um sabor doce e agradável (PENNINGTON, 1991). Está intimamente relacionado à cultura das civilizações pré-colombianas do México e América Central, e por muitos anos, o látex extraído do tronco foi uma importante matéria-prima para a fabricação do chiclete. Atualmente, gomas sintéticas substituíram as naturais e, na maioria dos países produtores, o sapotizeiro

é cultivado, principalmente, para produção de frutos consumidos *in natura* (SILVA JUNIOR et al., 2014).

Na medicina popular as folhas são utilizadas no tratamento de tosse, resfriados e diarreia (LOHÉZIC-LE DÉVÉHAT et al., 1992); já as sementes esmagadas são diuréticas e febrífugas enquanto as cascas têm ação adstringente e também febrífuga (MORAIS et al., 2008).

Atividades biológicas importantes de partes de *M. zapota* foram reportadas na literatura. Os extratos das folhas possuem potente atividade antioxidante (CHANDA; NAGANI, 2010; KANERIA et al., 2009), ação analgésica (JAIN et al., 2011), ação antimicrobiana (ABU OSMAN et al., 2011), atividades antihiperglicêmica e hipocolesterolêmica (FAYEK et al., 2012) e também ação acaricida (RAJAKUMAR; RAHUMAN, 2012). Os extratos das cascas por sua vez apresentam ação contra diarreias e desinterias (NAGANI; KANERIA; CHANDA, 2012); os extratos dos frutos apresentaram ação antioxidante (MA et al., 2003) os extratos das sementes apresentam ação antifúngica (OTARI et al., 2014) e antioxidante (KANLAYAVATTANAKUL; LOURITH, 2011). As propriedades farmacológicas descritas foram relacionadas à presença de compostos tais como triterpenos, saponinas, compostos fenólicos e glicosídeos.

Estudos fitoquímicos para identificação dos compostos predominantes nessa espécie confirmam, como principais constituintes químicos, os ácidos fenólicos (folhas e frutos) (FAYEK et al., 2012, 2013), flavonoides (MA et al., 2003; SUBRAMANIAN; NAIR, 1972), taninos (principalmente em frutos imaturos) (MA et al., 2003; SHUI; WONG; LEONG, 2004), triterpenos (cascas) (HART; LAMBERTON; TRIFFETT, 1973; MISRA; NIGAM; MITRA, 1969) e saponinas (principalmente em sementes) (AHMED et al., 2008; HART; LAMBERTON; TRIFFETT, 1973).

Silva Júnior e colaboradores (2014) comentam que dentre os frutos tropicais ainda subutilizados no Brasil, o sapoti é um dos que apresenta maior potencial para exploração econômica, o que favoreceu a expansão do seu cultivo em regiões úmidas do litoral e nas áreas irrigadas do semiárido nordestino. O mesmo autor comenta ainda que alguns avanços nas pesquisas com essa planta podem ser notados, ainda que no Brasil, projetos de pesquisa e desenvolvimento dedicados ao sapoti ainda sejam modestos.

2.2. *Mimusops commersonii* (G. Don) Engl.

Mimusops commersonii (G. Don) Engl., sinônimo para o nome *Mimusops balata* (Aubl.) C.F.Gaertn, conta com outros sinônimos tais como *Manilkara bidentata* (A. DC.) A. Chev., *Achras balata* Aubl. e *Mimusops imbricaria* Willd (THE PLANT LIST, 2013; TROPICOS, 2016). Segundo Swenson e Anderberg (2005) os gêneros *Mimusops* e *Manilkara* são muito próximos, no entanto há distinções quanto à filogenia, porém se observa um vasto número de espécies que apresentam esses dois gêneros como sinônimos.

Esta planta pertence à família Sapotaceae, é popularmente conhecida no Brasil como abricó-da-praia e nas regiões de origem como balata (Figura 3) (SCHLICKMANN et al., 2015). É uma espécie nativa de uma grande área do norte da América do Sul, América Central e Caribe. No México e no Brasil fornece a goma de balata, um tipo de látex que é extraído dessa árvore e empregado na obtenção de gomas de mascar (RHOURLI-FRIH et al., 2013).

Figura 3: *Mimusops commersonii* (G. Don) Engl e detalhes das folhas e frutos.



Fonte: Pomar do CPQBA (Foto: Layany Mourão).

A árvore produz látex, mas há poucos relatos referentes à composição e às propriedades biológicas desta resina. Há relatos que sua madeira causa irritações cutâneas (JESSEN et al., 2009). O látex foi relatado na medicina tradicional com ação contra a disenteria, assim como as cascas do tronco (RHOURLI-FRIH et al., 2013).

Um estudo bioguiado de extratos metanólicos de casca, polpa e sementes dos frutos comestíveis de *Mimusops balata* (*M. commersonii*) foi realizado buscando identificar o potencial gastroprotetor das partes da planta. Dessa forma foi possível demonstrar que o extrato das sementes apresentou ação gastroprotetora efetiva (SCHLICKMANN et al., 2015).

Considerando o gênero *Mimusops* há relatos de que os extratos obtidos de partes das diferentes espécies apresentam potencial biológico (BALIGA et al., 2011). Algumas espécies como *Mimusops elengi* estão bem documentadas na literatura. Extratos das folhas apresentaram ação antiparasitária, antimicrobiana e analgésica (SINGH et al., 2014), os frutos são reportados por sua atividade antioxidante (BOONYUEN et al., 2009), os extratos das cascas apresentaram ação moluscicida (SIGH; SIGH; SIGH, 2012), gastroprotetora (SHAH et al., 2003 apud SCHLICKMANN et al., 2015) e antioxidante (SHAHWAR; RAZA, 2012), já o extrato das sementes apresentou ação antimicrobiana e antioxidante (KUMAR et al., 2014).

Quanto à composição química da espécie, os dados ainda são um tanto escassos. Na porção saponificada da resina foram identificados os compostos balataresinol, balatol, ciclolaudenol e análogos C₄-monometilados de ciclolaudenol (LAWRIE; MCLEAN; OLUBAJO, 1970). O mesmo autor identificou na porção não saponificada a presença dos triterpenos tetracíclicos, cicloartenol e cicloartenol-24-metileno, além de esqualeno, β -amirina, lupeol e das cetonas derivadas dos álcoois, cicloartenona, 24-metilenocicloartenona, β -amirenona e lupenona.

Em estudos realizados por Rhourri-Frih et al. (2013) foram isolados dois urs-12-enos (3 β -O-acetil- α -amirina e 3 β -O-trans cinamil- α -amirina) e um derivado do tipo lupano (3 β -O-trans cinamil lupeol) além do esqualeno, lupeol, cicloartenol, α -amirina e β -amirina.

3. Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs)

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2017a) as Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) são um grupo de doenças transmissíveis que prevalecem em condições tropicais e subtropicais em 149 países e afetam mais de um bilhão de pessoas, custando às economias em desenvolvimento bilhões de dólares a cada ano. Elas acometem principalmente as populações empobrecidas e marginalizadas, que vivem em áreas sem saneamento adequado e/ou em estreito contato com vetores infecciosos. Embora não sejam comumente fatais, essas

doenças são associadas à deficiência crônica, desnutrição, estigmatização e exclusão social, à problemas de saúde mental e perda de oportunidades educacionais e de emprego (WAITE et al., 2016).

A pobreza é usualmente vista como uma causa raiz das DTNs devido à sua íntima associação com as condições de vida e de trabalho da população afetada, que possui dificuldade de acesso aos serviços de saúde preventivos e curativos. É válido ressaltar que as DTNs têm forte influência no empobrecimento dos indivíduos acometidos devido à ausência, nos países em desenvolvimento, de sistemas de proteção social, incluindo seguro-saúde para cobrir despesas com o agravo decorrente das infecções e seguro por doença e invalidez que garantiria a renda em casos de comprometimento por doença ou deficiência (HOUWELING et al., 2016).

DTNs podem ser causadas por parasitas (helmintos e protozoários), bactérias, fungos, ectoparasitas ou vírus. Elas incluem as infecções helmínticas transmitidas pelo solo (ascaridíase, ancilostomíase e tricuriase), filariase linfática, oncocercose, dracunculose, esquistossomose, doença de Chagas, tripanossomíase africana humana, leishmaniose, úlcera de Buruli, lepra e tracoma. A lista expandida pode incluir ainda, dengue, treponematoses, leptospirose, estrongiloidíase, trematodíases transmitidas por alimentos, neurocisticercose e escabiose, bem como outras infecções tropicais (HOTEZ et al., 2007). As listas de DTNs diferem por enfoque organizacional nas regiões afetadas, mas cada uma dessas doenças é responsável pela morbidade de milhões de pessoas por ano (NODEN; VAN DER COLF, 2013).

Em termos de anos de vida comprometidos por doença (DALY) (WHO, 2016) esse grupo de doenças é responsável por cerca de 57 milhões de anos de vida comprometidos por ano e 90% desse total resulta da alta prevalência e difícil controle de sete principais doenças que figuram essa lista¹ (HOTEZ et al., 2007).

Variações significativas na atribuição de DALYs às DTNs são devidas a muitos fatores, incluindo escassez de dados, dificuldades inerentes em estimar com

¹ Ascaridíase, tricuriase, infecções causadas por ancilóstomos, esquistossomose, filariose linfática, tracoma e oncocercose (HOTEZ et al., 2007).

precisão o número de indivíduos em risco, o número de casos incidentes, o número de casos prevalentes e a duração das infecções (HOTEZ et al., 2014).

Várias das principais DTNs mundiais ocorrem no Brasil, no entanto, o impacto dessas doenças difere por região, e existe uma relação direta com o índice de desenvolvimento (IDH). Assim, as regiões Norte e Nordeste apresentam a maior prevalência dessas doenças. As populações mais afetadas por DTNs vivem em áreas rurais e subúrbios das grandes cidades nos quais as condições socioeconômicas e sanitárias são extremamente precárias (LINDOSO, LINDOSO, 2009).

Os mecanismos de financiamento global para o tratamento das DTNs devem considerar que os programas de controle devem ser de propriedade nacional, incorporados aos planos nacionais de saúde desenvolvidos de acordo com o perfil das comunidades afetadas (MOLYNEUX; MALECELA, 2011).

Desde 2006, mais de 7 bilhões de pessoas com DTNs têm sido curadas. Cerca de 850 milhões de pessoas com filariose linfática, esquistossomose, helmintíases transmitidas pelo solo (HTS), oncocercose e tracoma receberam tratamento em 2014. Estima-se que 1,4 bilhões de pessoas acometidas por DTNs serão tratadas de 2015 a 2020 o que exige um investimento direto de US\$ 2,8 bilhões no tratamento de DTNs durante esses 5 anos (FITZPATRICK et al., 2016).

Quanto à disponibilidade de fármacos desenvolvidos exclusivamente para DTNs, os investimentos são claramente insuficientes (REDDY et al., 2007). Embora 1.556 novos fármacos tenham sido desenvolvidos no mundo de 1975 a 2004, apenas 21 deles foram indicados para o tratamento de pacientes com alguma DTNs (RENSLO; McKERROW, 2006).

Fitzpatrick e colaboradores (2016) afirmam que quatro fármacos (albendazol, azitromicina, ivermectina ou dietilcarbamazina e praziquantel) são necessários para tratar as seis doenças supracitadas e a estratégia de administração para reduzir a morbidade e prevenir a transmissão das doenças é similar. O que pode auxiliar no tratamento, prevenção e controle em comunidades afetadas.

Um destaque para a pesquisa e desenvolvimento de fármacos no tratamento de DTNs e doenças de alta prevalência, foi observado em 2015. O

trabalho de William Campbell e Satoshi Omura no desenvolvimento da ivermectina² (BURG et al., 1979; EGERTON et al., 1979) e o estudo de You You Tu (TU, 1981, 2011) que culminou no isolamento da artemisinina³, dividiram o Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia de 2015.

Esse reconhecimento representa um importante fato para comunidade científica voltada para DTNs, devido à relativa falta de interesse da indústria farmacêutica, a prevalência dessas infecções, o mínimo financiamento e a escassez de interesse na investigação dessas doenças. Espera-se que a atribuição desse prêmio seja visto como um apelo à valorização dos trabalhos desenvolvidos nessa área (MCKERROW, 2015).

As descobertas realizadas por Omura, Campbel e You you Tu com o advento da ivermectina e da artemisinina representam um estímulo muito importante para o nosso estudo por duas razões: a primeira é que os compostos desenvolvidos tiveram como alvo doenças parasitárias que afetam as populações mais pobres do mundo e, portanto, representam um entrave na melhoria da saúde mundial; o segundo fator é que esses fármacos foram desenvolvidos a partir de fontes naturais, como é proposto em nosso trabalho.

4. Estrongiloidíase

O *Strongyloides stercoralis*, um nematoide transmitido pelo solo, é um dos mais negligenciados dentre os geohelminhos causadores de DTNs. Ocorre em quase todo o mundo, excluindo apenas os extremos norte e sul, mas as estimativas sobre sua prevalência são muitas vezes modestas suposições. Em comparação ao grupo de helmintos transmitidos pelo solo, *Ascaris lumbricoides*, *Necator americanus*, *Ancilostoma duodenale*, e *Trichuris trichiura*, as informações sobre *S. stercoralis* são escassas (SCHÄR et al., 2013).

Atualmente, a estrongiloidíase é predominantemente descrita como uma DTN, encontrada em áreas tropicais e subtropicais (Sudeste asiático, África, América

² A avermectina foi isolada de culturas de *Streptomyces* do solo. A ivermectina, seu análogo, é empregada no tratamento da oncocercose, filariose linfática e outras helmintíases.

³ A artemisinina foi isolada a partir da espécie vegetal *Artemisia annua* L. e tem ação frente às diferentes espécies do gênero *Plasmodium* sp.

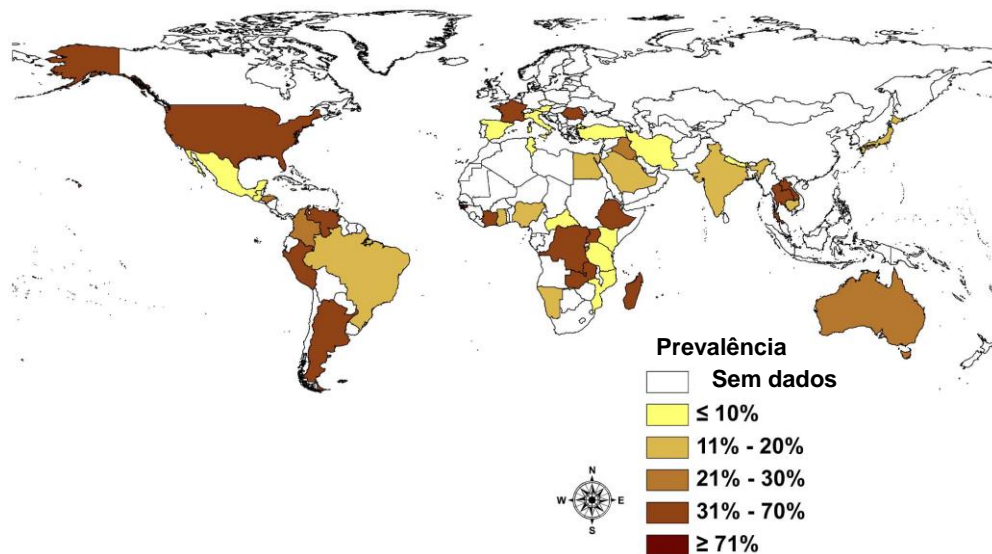
Central e do Sul). No entanto, estudos recentes incluem países das zonas temperadas nas áreas endêmicas da estrogiloidíase. Há também casos da doença em algumas partes da mesma zona climática, mas não em outras. Isso indica que a condição climática não é o fator determinante para a infecção. De fato, a ausência de saneamento e baixas condições socioeconômicas são vistos como os principais fatores de risco para o desenvolvimento da doença (BEKNAZAROVA; WHILEY; ROSS, 2016).

Estima-se que cerca de 30 a 100 milhões de pessoas estão infectadas com estrogiloidíase em todo o mundo (OLSEN et al., 2009; SCHÄR et al., 2013; WHO, 2017b). A morbidade atribuível a essa infecção ao longo da vida é pouco estudada, mas a morbidade e mortalidade relacionadas a indivíduos imunossuprimidos são relatadas na literatura (LUSTIGMAN et al., 2012). Muitos aspectos epidemiológicos da infecção por *S. stercoralis* são desconhecidos ou mal documentados, mas dados de estudos recentes sugerem taxas de prevalência entre 10% e 40%, possivelmente até 60% em áreas tropicais e subtropicais (FORRER et al., 2016).

Devido à dificuldade no diagnóstico e monitoramento da doença, a estrogiloidíase tem sido negligenciada ao longo dos anos no tocante às estratégias para reduzir a carga e controlar DTNs através de intervenções de saúde pública (KROLEWIECKI et al., 2013). As infecções por *S. stercoralis* raramente são detectadas e muitas áreas sem informação persistem no mapa de distribuição global da estrogiloidíase (Figura 4).

Dados da OMS (WHO, 2017b) apontam que nenhuma estratégia de saúde pública foi desenvolvida diretamente para controle da estrogiloidíase. Sabe-se que essa doença está em vias de extinção em países nos quais o tratamento dos dejetos humanos e as condições de saneamento melhoraram. Nas áreas onde o tratamento em massa com ivermectina tem sido utilizado para controlar a oncocercose ou filaríose linfática, a prevalência da estrogiloidíase é reduzida, mas devido à dificuldade de diagnóstico da doença faz-se necessária uma investigação mais aprofundada.

Figura 4: Prevalência da infecção por *S. stercoralis* a partir de dados dos serviços de saúde.



Adaptado de Schär et al., (2013).

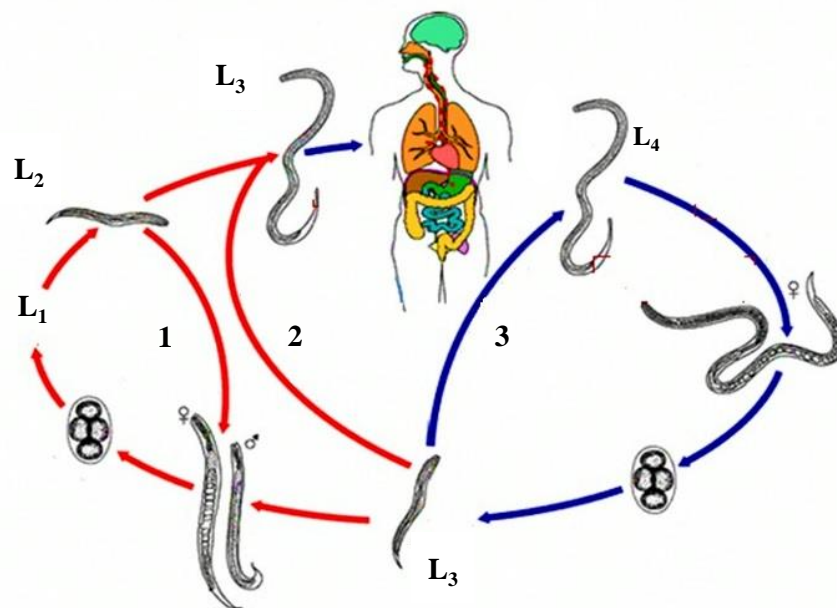
O gênero *Strongyloides* é classificado na ordem Rhabditida, a maioria das 52 espécies são nematóides do solo, que não infectam seres humanos. *S. stercoralis* e *S. fuelleborni*, são as espécies causadoras da estrongiloidíase humana e além delas são relatadas mais duas espécies, *S. myopotami* e *S. procyonis*, que infectam animais e podem ser responsáveis por infecções zoonóticas (PUTHIYAKUNNON et al., 2014). A espécie *S. venezuelensis* infecta naturalmente os roedores e tem patogenia semelhante àquela desenvolvida pelo *S. Stercoralis* em humanos é freqüentemente empregada em modelos experimentais para o estudo da estrongiloidíase (GONÇALVES et al., 2016).

A fêmea adulta parasitária é um verme longilíneo que mede de 2,2 a 2,5 mm de comprimento, tem um diâmetro de 50 µm e vive em túneis entre enterócitos no intestino delgado. Os machos parasitários, embora existam, não têm qualquer papel nas infecções humanas e são facilmente eliminados nas fezes (SPEARE 1989; NEVA, 1994 apud PUTHIYAKUNNON et al., 2014).

O *S. stercoralis* apresenta uma complexa fase de desenvolvimento com dois ciclos de vida distintos (Figura 5), um ciclo heterogônico de vida livre (setas vermelhas) e um ciclo de vida parasítico que se completa dentro do hospedeiro (setas azuis) (VINEY; LOK, 2007).

Os vermes adultos que vivem livres reproduzem-se sexualmente e dão origem a larvas que evoluem para indivíduos de vida livre ou para formas infectantes (filariformes) mantendo a infestação do solo. Um novo hospedeiro é infectado com larvas filariformes que penetram através da pele ou mucosas e migram através dos vasos linfáticos e veias atingindo a circulação pulmonar produzindo hemorragias nos capilares pulmonares. As larvas se encaminham para os espaços alveolares e causam respostas inflamatórias associadas à infiltração eosinofílica que podem culminar em pneumonite. Por fim as larvas ascendem o trato respiratório e são deglutidas atingindo o intestino. A maturação das larvas em fêmeas adultas ocorre no intestino e a partir daí elas produzem ovos via partenogênese. Os ovos eclodem no intestino em larvas não infecciosas rabditiformes, que podem alcançar o ambiente através de fezes dando continuidade à fase heterogônica de vida livre no solo ou são também responsáveis pela autoinfecção após a transformação em larvas filariformes infecciosas que penetram a mucosa intestinal ou perianal reiniciando um novo ciclo de infecção sem nunca deixar seu hospedeiro (BEKNAZAROVA; WHILEY; ROSS, 2016; OLSEN et al., 2009; PUTHIYAKUNNON et al., 2014).

Figura 5: Duplo ciclo evolutivo do *S. Stercoralis* com fases heterogônica e parasítica.



L₁: Larva recém eclodida; **L₂:** Larva rabditoide de vida livre; **L₃:** Larva filarióide infectante **L₄:** Larva após maturação no pulmão. **(1):** Geração de adultos de vida livre **(2):**

Desenvolvimento da larva filarióide no ambiente **(3)**: Autoinfecção. **Setas vermelhas**: fase heterogônica; **Setas azuis**: fase parasítica. Adaptado de WGO Practice Guidelines, (2004).

O *S. stercoralis* é único em sua capacidade de replicar-se no hospedeiro humano, permitindo ciclos contínuos de autoinfecção. Dessa forma, a doença pode persistir durante décadas sem a exposição adicional a infecções exógenas o que pode resultar em uma ampla variedade de manifestações clínicas (MONTES; SAWHNEY; BARROS, 2010).

A estrongiloidíase pode causar sintomas gastrointestinais, incluindo dor abdominal, diarreia, náuseas e vômitos, problemas de pele incluindo prurido e dermatite ou sintomas respiratórios como tosse, asma e dispnéia. A hiperinfecção ou a estrongiloidíase disseminada podem afetar vários órgãos, levando a resultados fatais. A forma crônica assintomática é outra preocupação importante, pois quando associada ao tratamento imunossupressor tem potencial para tornar-se uma infecção disseminada (PUTHIYAKUNNON et al., 2014). Uma associação forte tem sido observada entre a estrongiloidíase e distúrbios imunossupressores concomitantes, como a infecção por HTLV-I (vírus linfotrópico de células T humanas) ou HIV (vírus de imunodeficiência humana) e ainda neoplasias malignas hematológicas (VADLAMUDI; CHI; KRISHNASWAMY, 2006).

A estrongiloidíase é uma das infecções de mais difícil diagnóstico dentre as parasitoses (DE CARVALHO et al., 2015; SIDDIQUI et al., 1997). O método mais utilizado é a técnica de Kato-Katz que detecta ovos nas fezes, mas não demonstra larvas (PAULA; COSTA-CRUZ, 2011; SCHERRER et al., 2009). O método padrão de concentração em formol-éter é limitado pela baixa concentração das larvas nas fezes em quadros crônicos. Os métodos de concentração parasito-específica como a técnica de Baermann e métodos de cultura são muito mais sensíveis, mas em infecções leves (crônicas) a detecção ainda é falha (VLAMINCK et al., 2010). Somente em pacientes com forte estrongiloidíase a grande quantidade de larvas pode ser detectada, em fezes, escarro, urina e fluidos pulmonares, bem como em biópsias de órgãos. Infecções crônicas não complicadas de *S. stercoralis* também causam patologias sutis, inespecíficas e a infecção muitas vezes permanece sem diagnóstico (OLSEN et al., 2009).

Os fármacos empregados no tratamento da Estrongiloidíase são albendazol, tiabendazol, mebendazol e ivermectina, todos com alta possibilidade de

desenvolver resistência e não previnem a reinfecção além de apresentarem efeitos adversos ao longo do tratamento (BEKNAZAROVA; WHILEY; ROSS, 2016). A droga de escolha atual é a ivermectina (200 mg/kg), que age sobre os parasitas na forma adulta (MONTES; SAWHNEY; BARROS, 2010). O tratamento da Estrongiloidíase ainda representa um desafio para a adequação na terapêutica, considerando que a maior parte dos anti-helmínticos visa a redução da carga parasitária o que nessa enfermidade não se aplica devido a possibilidade de auto-infecção garantida pela partenogênese.

Nos dias atuais, a estrongiloidíase continua a ser um problema de saúde pública subestimado, tal como foi no início do século passado (1901) quando o professor William Sydney Thayer publicou a revisão “On the Occurrence of *Strongyloides intestinalis* in the United States.”. Mais de um século depois, as questões-chave relativas a este parasita tais como diagnóstico e tratamento são essencialmente as mesmas, e embora os investigadores tenham recentemente dado mais atenção a esta infecção, os planos de ação sistemática para detecção, controle e prevenção ainda permanecem negligenciados (BISOFFI et al., 2013).

5. Infecções microbianas

As doenças infecciosas microbianas continuam a ser uma das principais causas de morbidade e mortalidade. Estima-se que as espécies microbianas constituem cerca de 60% da biomassa da Terra. Isso, juntamente com o fato de que sua diversidade genética, metabólica e fisiológica é extraordinária, torna-as uma grande ameaça para a saúde e desenvolvimento das populações em todo o mundo (RADULOVIĆ et al., 2013).

Dados da Organização Mundial de saúde (WHO, 2013) apontam que dentre as dez principais causas de morte no mundo cinco são causadas microbianas. Em países em desenvolvimento, quase 4 em cada 10 mortes são de crianças menores de 15 anos e apenas 2 em cada 10 mortes são de pessoas com 70 anos ou mais. Predominam as mortes por doenças infecciosas: infecções respiratórias inferiores, HIV/AIDS, doenças diarreicas, malária e tuberculose sendo essas coletivamente responsáveis por quase um terço de todas as mortes nesses países.

Doenças infecciosas causadas por bactérias e fungos são uma das maiores causas de morte, incapacidade, entrave social e econômico para milhões de pessoas no mundo. Aproximadamente 15 milhões de indivíduos morrem a cada ano devido a uma doença infecciosa (BERMAN, 2004 apud ISLAM et al., 2013). Tal fato representa uma ameaça para a saúde pública, apesar dos enormes progressos na medicina. Esse impacto é particularmente maior nos países em desenvolvimento devido à relativa indisponibilidade de medicamentos e a crescente resistência dos microrganismos aos fármacos (OKEKE et al., 2005; WHO, 2014).

As infecções causadas por *Staphylococcus aureus* incluem afecções de pele e mucosas, síndrome de choque tóxico, endocardites, osteomielites, infecções do trato urinário e intestinais. Essas infecções são globais e marcadas pelo aumento drástico da resistência aos antibióticos, o que torna o tratamento e controle dessas doenças ainda mais difícil. (SNOWDEN et al., 2014).

Os fungos dermatófitos têm a capacidade de invadir tecidos queratinizados de animais e humanos. Dentre eles, o *Trichophyton rubrum* é o mais prevalente no mundo e representa 80% dos isolados clínicos. Outro importante fungo patogênico é *Candida albicans*, a espécie mais prevalente na candidíase, uma infecção oportunista responsável por uma variedade de manifestações de doenças humanas, desde lesões cutâneas superficiais até infecções disseminadas. (CRUZ et al., 2007).

Desde a antiguidade e até a idade moderna, diferentes espécies de plantas são usadas no tratamento de doenças infecciosas comuns. Por exemplo, o bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng) e o cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) são usados para tratar infecções do trato urinário (RADULOVIC; BLAGOJEVIC; PALIC, 2010), enquanto o óleo de melaleuca (*Melaleuca alternifolia* (Maiden e Betcher) Cheell) é uma ferramenta terapêutica comum para tratar a acne e outros problemas infecciosos da pele (CARSON et al., 2002).

Assim, a necessidade de descobrir e desenvolver novos agentes antimicrobianos é fundamental para melhorar a saúde futura da humanidade. Os metabólitos secundários das plantas (MSPs) oferecem uma promessa particular nesse sentido. O Reino *Plantae* poderia ser considerado uma rica fonte das mais diversas estruturas (por exemplo, existem mais de 12.000 alcalóides conhecidos, mais de 8.000 compostos fenólicos e mais de 25.000 terpenoides diferentes), muitos

dos quais possuem potente ação antimicrobiana comprovada (por exemplo, timol, eurabienol, entre outros) (RADULOVIC; BLAGOJEVIC; PALIC, 2010).

Assim, a descoberta de novos compostos com estruturas químicas e mecanismos de ação diferentes dos antimicrobianos e anti-helmínticos usuais representa uma necessidade urgente, devido ao aumento na incidência de doenças infecciosas novas e reemergentes, a ineficácia dos tratamentos com anti-helmínticos de amplo espectro e principalmente, ao agravamento da resistência aos fármacos já empregados na terapêutica, desenvolvida tanto por microrganismos patogênicos quanto por parasitas intestinais (CARVALHO et al., 2012; NAIR; CHANDA, 2008).

CAPÍTULO 2

MATERIAL E MÉTODOS

1. Coleta e identificação do material vegetal

As folhas de *Manilkara zapota* (Mz) e *Mimusops commersonii* (Mc) foram coletadas no mês de setembro de 2013 da Coleção de Plantas Frutíferas do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP) em Campinas – SP, Brasil (22° 47' 52" S, 47° 6' 49" O). As exsiccatas estão depositadas no Herbário do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas sob os registros UEC186541 e UEC186526, respectivamente. O fornecimento do material foi feito pela Divisão de Agrotecnologia do CPQBA. Os nomes das espécies foram confirmados a partir da consulta a diferentes sites botânicos, tais como Tropicos e The Plant List.

2. Obtenção dos extratos, frações e compostos isolados de *M. zapota* e *M. commersonii*

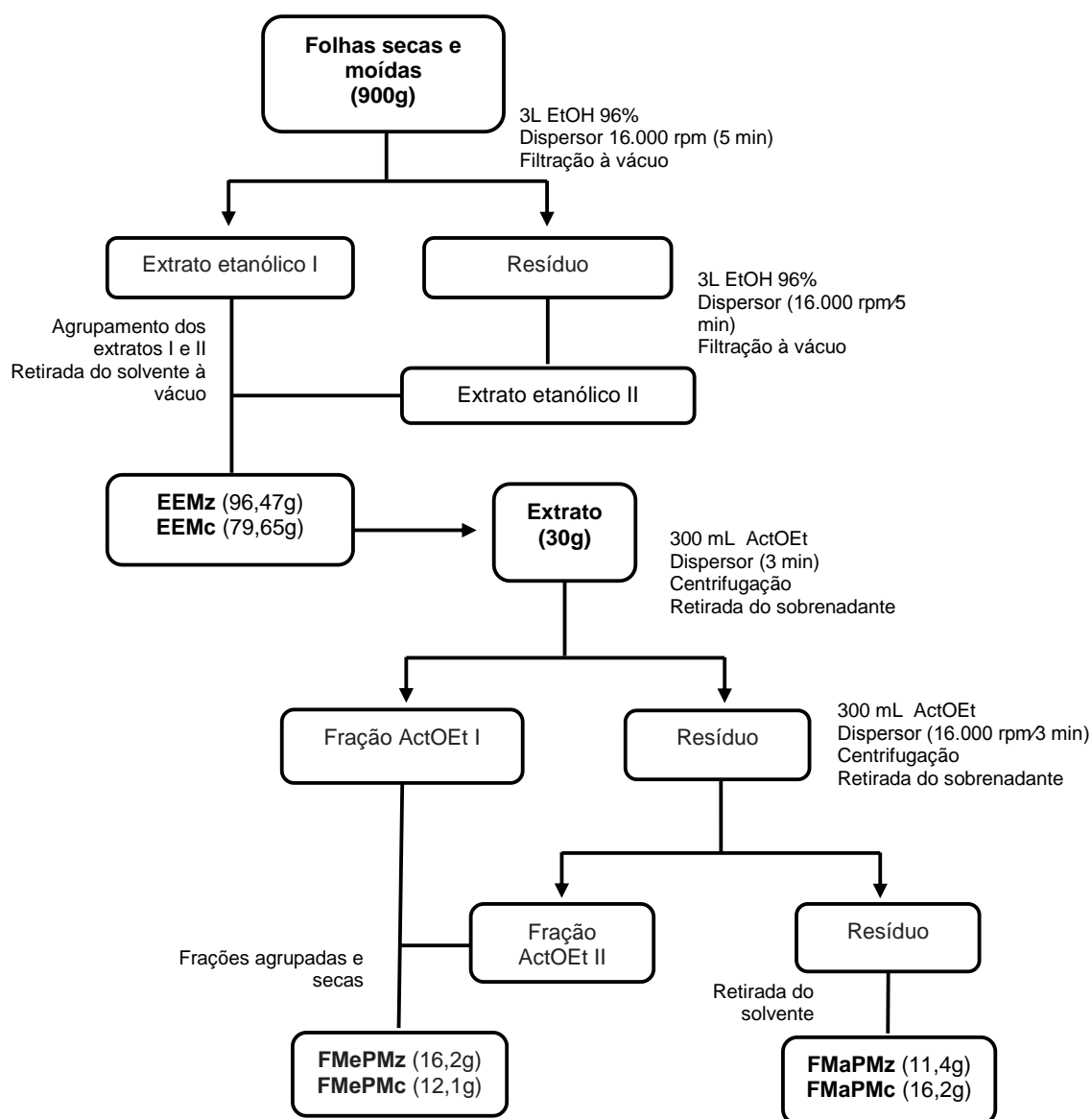
2.1. Extração e fracionamento inicial

Os extratos etanólicos foram preparados de modo análogo para ambas as espécies, a partir de 900 g das folhas secas e moídas. O processo de extração foi realizado em dispersor (Ultra Turrax T50, IKA Works Inc., Carolina do Norte, EUA) utilizando 3 L de etanol 96 % PA (Synth®, São Paulo, Brasil) como solvente a temperatura ambiente e 16.000 rpm durante 5 min, seguido de filtração a vácuo. O resíduo da planta foi reextraído de modo semelhante à primeira extração. Os extratos foram agrupados e o solvente removido a vácuo em evaporador rotativo (Fisatom mod.802, São Paulo, Brasil), fornecendo assim os extratos brutos secos de *M. zapota* – EEMz (96,47g) e *M. commersonii* – EEMc (79,65 g) (Figura 6).

Alguns processos de fracionamento dos extratos etanólicos foram testados com objetivo de obter as frações de diferentes polaridades devidamente separadas, para avaliação de suas atividades biológicas no estudo e, além disso, dar continuidade ao fracionamento e a purificação das substâncias de interesse. O método que apresentou a melhor separação dos componentes foi a turbolização, semelhante à obtenção dos extratos etanólicos. Os extratos etanólicos de Mz e Mc (30 g) foram transferidos separadamente para béqueres e a eles foi adicionado 300 mL de acetato de etila (Synth®, São Paulo, Brasil). A extração dos compostos de

média e baixa polaridade foi realizada em dispersor ultra turrax (16.000 rpm, durante 3 min) em temperatura ambiente. As soluções obtidas foram centrifugadas (CIENTE 5500D, Minas Gerais, Brasil) por 3 min a 3.000 rpm e os sobrenadantes foram reservados.

Figura 6: Fluxograma de obtenção de extratos e frações primárias de *M. zapota* e *M. commersonii* por turbolização.

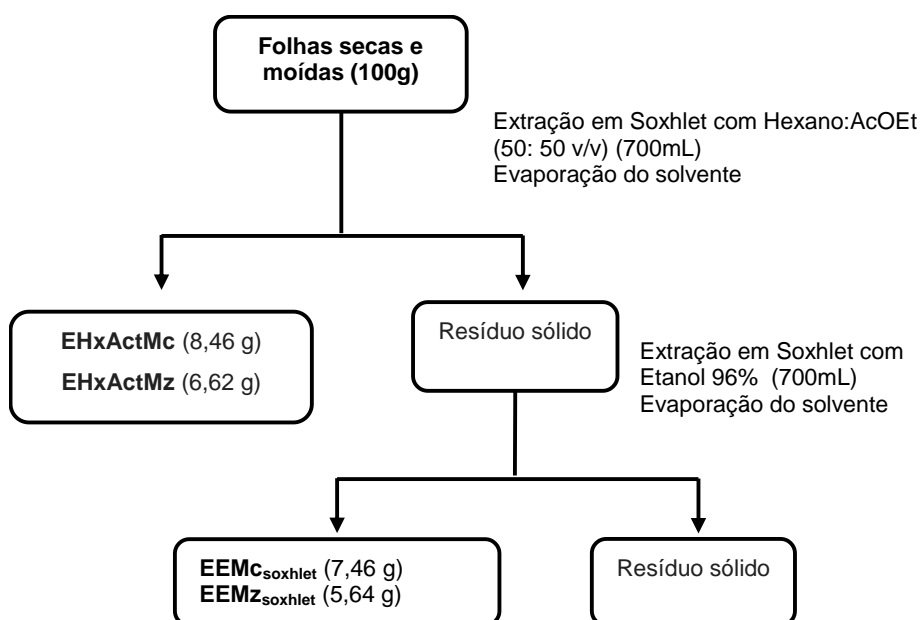


Mz: *M. zapota*; Mc: *M. commersonii*; EE: extrato etanólico; FMeP: Fração de menor polaridade; FMaP: Fração de maior polaridade.

Os resíduos sólidos provenientes da centrifugação foram re-extraídos de modo semelhante à primeira extração. As frações em acetato de etila obtidas foram agrupadas e concentradas em evaporador rotativo até secura total resultando nas frações FMePMz (16,25 g) e FMePMc (12,13 g). Os resíduos sólidos finais (que continham os compostos de maior polaridade) foram secos a vácuo resultando nas frações FMaPMz (11,44 g), FMaMc (16,25 g). Todas as amostras obtidas foram utilizadas nos testes de atividade *in vitro*.

Extratos de *M. zapota* e *M. commersonii* também foram obtidos utilizando solventes de diferentes polaridades por extração em Soxhlet (Figura 7) Duas extrações sucessivas foram realizadas empregando hexano: acetato de etila (50:50 v/v) seguida de extração com etanol 96 %. A partir daí foram obtidos os extratos em hexano:acetato de etila (EHxAcMz e EHxAcMc) e os extratos etanólicos (EEMz_{soxhlet} e EEMc_{soxhlet}). Os extratos EHxAcMz e EHxAcMc foram analisados por cromatografia à gas e a atividade biológica dos mesmos também foi avaliada.

Figura 7: Fluxograma de obtenção de extratos de *M. zapota* e *M. commersonii* por extração em soxhlet.



Mz: *M. zapota*; Mc: *M. commersonii*; EHxAc: extrato obtido com Hexano: acetato de etila (50: 50 v/v); EE: Extrato etanólico.

2.2. Fracionamento e purificação

2.2.1. Cromatografia de adsorção em coluna de poliamida

Esta etapa foi destinada à purificação das frações de maior polaridade de ambas as espécies, utilizando uma menor quantidade de amostra. Realizou-se a separação de 50 mg de FMaPMc e FMeOHMc em coluna de poliamida PA Chromabond® (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha), utilizando o metanol (CH₃OH) como fase móvel I (10 mL) e o acetato de etila como fase II (lavagem da coluna). Esse processo foi repetido 10 vezes totalizando 500 mg de amostra. As frações metanólicas foram agrupadas e o solvente foi evaporado à vácuo fornecendo FMeOHMc (497 mg) e FMeOHMz (325,6 mg).

2.2.2. Extração em fase sólida (SPE)

Após a separação em poliamida, foi empregada a extração em fase sólida (SPE) das frações FMeOHMc (497 mg) e FMeOHMz (325,6 mg). A SPE, em ambos os casos foi realizada em coluna C18 (Strata, 20 g/60 mL, 55 µm, 70 Å - Phenomenex®) utilizando água, metanol (CH₃OH) e acetonitrila (CH₃CN) como solventes. O gradiente de solventes utilizado (60 mL) está apresentado na Tabela 1 e forneceu 6 sub-frações (I, II, III, IV, V e VI), o solvente foi retirado em evaporador à vácuo Genevac HT-4X (Ipswich, Suffolk, Reino Unido). A partir da observação dos perfis cromatográficos (HPLC) a fração IV foi selecionada para purificação.

Tabela 1: Esquema de solventes empregado na Extração em Fase Sólida (SPE).

Sub-frações	Esquema de solventes	Proporção	Massa (mg)
I	H ₂ O	1	130,3
II	H ₂ O : CH ₃ OH	4 : 1	47,3
III	H ₂ O : CH ₃ OH	1 : 1	30,5
IV	H ₂ O : CH ₃ CN : CH ₃ OH	1 : 1 : 1	111,1
V	CH ₃ CN : CH ₃ OH	1 : 1	13,1
VI	CH ₃ CN	1	1,04

2.2.3. Cromatografia em Sistema Flash

Para realizar a separação dos componentes utilizando uma maior massa das frações de maior polaridade, FMaPMz e FMaPMc (2,0 g) foi empregado o sistema de Cromatografia Flash. O fracionamento da amostra FMaPMz foi realizado em sistema LC Flash Combi Flash® Rf+ Teledyne ISCO (Nebraska, EUA) equipado

com detector UV-vis, utilizando coluna RediSep®Rf C18 86g, fluxo de 60 mL·min⁻¹ e água e acetonitrila como solventes.

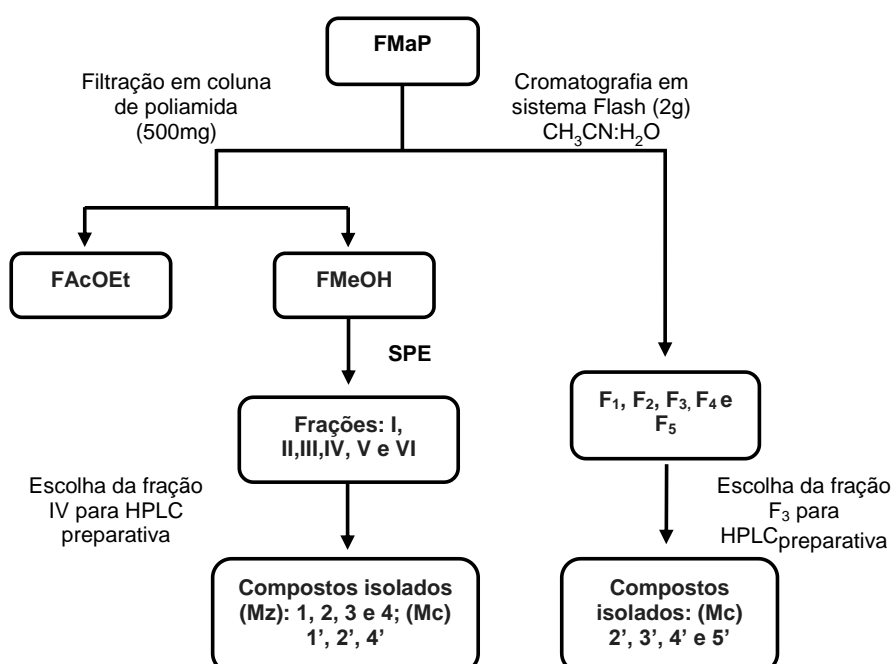
Para a separação da FMaPMc foi utilizado o sistema LC Flash Grace Reveleris (Maryland, EUA) com detecção dual ultravioleta e evaporativa com espalhamento de luz (UV/ELSD) com coluna C18 Reveleris® 120 g, fluxo de 85 mL·min⁻¹ com acetonitrila e água como solventes.

A separação, nos dois casos, originou 5 subfrações cada (F₁ a F₅) e o gradiente H₂O – CH₃CN empregado foi o mesmo para ambas as espécies (80/20 por 6 min, 80/20 para 70/30 em 1s, 70/30 por 6 min, 70/30 para 60/40 em 1s, 60/40 por 6 min, 60/40 para 50/50 em 1 s, 50/50 por 6 min, 50/50 para 0/100 em 1s e 0/100 por 6 min). A fração F3 obtida na separação em coluna Flash para as duas espécies foi selecionada para dar continuidade ao processo de purificação.

2.2.4. Cromatografia Líquida Preparativa

Na Figura 8 estão apresentadas as etapas de obtenção dos compostos isolados de *M. zapota* e *M. commersonii* a partir das FMaP.

Figura 8: Etapas para obtenção dos compostos isolados de *M. zapota* e *M. commersonii* considerando a massa inicial da fração de maior polaridade.



Mz: *M. zapota*; Mc: *M. commersonii*; FMaP: Fração de maior polaridade; FAcOEt: Fração obtida em acetato de etila; FMeOH: Fração metanólica.

Para a purificação das frações F₃ e FIV foi utilizado um sistema de cromatografia líquida Dionex UltiMate 3000 preparativo (Massachusetts, EUA), com coletor de frações e acoplado a detector UV-VIS PDA com sistema dual, utilizando coluna C18 (250 x 21,20 mm, 5 micron – Phenomenex® Califórnia, EUA). Os solventes empregados foram água e acetonitrila com fluxo de 20 mL·min⁻¹.

O gradiente utilizado na purificação das frações de *M. zapota* foi: H₂O–CH₃CN (98/2 para 77/23 por 5 min, 77/23 para 55/45 por 15 min, 55/45 para 0/100 por 5 min). Já o gradiente empregado na separação das frações de *M. commersonii* foi: H₂O – CH₃CN (75/25 por 17 min, de 75/25 para 60/40 em 1 s, 60/40 por 2 min, de 60/40 para 0/100 em 1 s, 0/100 5 min. Assim, os compostos isolados da FMaPMz foram: **1** (3,5 mg), **2** (0,7 mg), **3** (13,8 mg) e **4** (4,6 mg). Já os compostos isolados da fração de maior polaridade de *M. commersonii* (FMaPMc) foram: **1'** (0,3 mg), **2'** (67 mg), **3'** (9,5 mg), **4'** (190,7 mg) e **5'** (4,9 mg).

3. Análise química de extratos, frações e compostos isolados de *M. zapota* e *M. commersonii*

3.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os perfis analíticos, foram obtidos em Cromatógrafo líquido analítico Dionex UltiMate 3000 (Massachusetts, EUA) equipado com detectores UV-PDA e Corona Veo (CAD – Detecção por Aerossol Carregado). Para *M. commersonii* foi utilizada coluna C18 analítica 150 x 4,6 mm, 5 micron – Phenomenex com fluxo de 1mL·min⁻¹ e fase móvel de H₂O – CH₃CN com acréscimo 5% de CH₃CN/3 min de 0 a 24 min (gradiente) e de 24 a 30 min acréscimo linear a 100% de acetonitrila. Para a obtenção dos perfis analíticos da *M. zapota* foi utilizada uma coluna C18 analítica Cortecs (150 x 4,6 mm 2,7µm - Waters®, Massachusetts, EUA) com fluxo de 1,6 mL·min⁻¹, fase móvel de H₂O – CH₃CN; de 100/0 a 80/20 em 5 min, de 80/20 a 50/50 em 17 min de 50/50 a 0/100 em 8 min. Todas as etapas de fracionamento e purificação das FMaPs foram monitoradas através dos seus perfis analíticos.

3.2. Cromatografia em camada delgada (CCD)

As análises em CCD foram realizadas em cromatoplasacas (10 cm de altura) de sílica gel 60 F254-Merck® (Darmstadt, Alemanha). As fases móveis foram definidas de acordo com as características dos compostos presentes nas amostras

analisadas. Para compostos com baixa ou média polaridade, a fase móvel utilizada foi uma mistura de hexano:acetato de etila (70:30 v/v ou 80:20 v/v). A detecção foi realizada por visualização das placas em câmara escura contendo lâmpadas ultravioleta (254 e 336 nm), seguida de revelação com solução de anisaldeído (ácido acético: ácido sulfúrico: anisaldeído 50 :1: 0,5 v/v) e aquecimento em estufa a 100 °C por 5 min.

Para observação dos constituintes de maior polaridade, utilizou-se como fase móvel uma solução composta por: acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100:11:11:26 v/v) seguido de revelação com NP (difetilboriloxietildiamina) e macrogol e avaliação sob luz UV 366 nm. Também foi utilizada como fase móvel a solução de clorofórmio: ácido acético: metanol: água (60: 32: 12: 8 v/v) e como revelador a solução de anisaldeído para verificar a presença de saponinas (WAGNER; BLADT, 1996).

3.3. Cromatografia em fase gasosa acoplada ao detector de massas (CG-EM)

A análise dos compostos presentes nos extratos EHxActMz e EHxActMc foi realizada em cromatógrafo a gás Agilent modelo 6890 (Califórnia, EUA) acoplado ao detector seletivo de massas (Agilent 5975) utilizando uma coluna capilar HP-5MS, J&W Scientific (Califórnia, EUA) de dimensões 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm nas seguintes condições: temperatura do injetor de 250 °C, temperatura da coluna variando de 110 °C até 280 °C (26 min) com taxa de aquecimento de 5°C·min⁻¹. 1 µL da amostra foi injetado em modo split (1:30). O hélio foi utilizado como gás de arraste numa vazão de 1mL·min⁻¹. O detector de espectrometria de massas foi operado com temperaturas de 300 °C na fonte e quadrupolo a 150 °C, energia de ionização de 70 eV e m/z = 40 a 600 u.m.a. A identificação dos compostos foi realizada a partir da interpretação dos padrões de fragmentação e a comparação dos espectros de massa obtidos com os dados da biblioteca NIST-11 (National Institute of Standards and Technology) e com os dados da literatura.

3.4. Análises por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a detector de massa de alta resolução (UPLC-HRESITOFMS)

As massas de alta resolução dos compostos isolados das FMaPs foram determinadas utilizando sistema UPLC (Waters® Acquity, Massachusetts, EUA)

equipado com coluna bypass, acoplado a espectrômetro de massas Waters® Micromass LCT Premier com fonte de ionização eletrospray e detecção por tempo de voo, operando no modo positivo e negativo. Soluções metanólicas dos compostos isolados foram preparadas e analisadas numa janela espectral de 0 a 1500 Da. Os dados obtidos foram tratados no software Waters MassLynx V4.1 (Massachusetts, EUA). A busca na literatura das moléculas sugeridas a partir das massas moleculares obtidas foi feita com o auxílio da base de dados REAXYS® (RELX INTELLECTUAL PROPERTIES SA., 2009).

3.5. Determinação do poder rotatório

A rotação óptica específica de cada composto isolado foi obtida em polarímetro Anton Paar MCP 300 (Graz, Austria) em cuba de 100 mm e 350 µL com concentração de 0,5g/100 mL em metanol.

3.6. Identificação estrutural das moléculas por Ressonância Magnética Nuclear

Os experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram realizados em equipamento Bruker Avance® 1 Tesla (500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C) (Massachusetts, EUA) equipado de uma sonda de detecção inversa de 5mm. Os compostos isolados foram dissolvidos em metanol deuterado (CD_3OD). A atribuição dos diferentes sinais foi feita com o auxílio de técnicas de RMN unidimensional, ^1H e ^{13}C , aliadas a experimentos de correlação bidimensional homonuclear ($^1\text{H} - ^1\text{H}$) COSY (CORrelation SpectroscopY) e heteronuclear ($^1\text{H} - ^{13}\text{C}$) HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) e HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation). Os espectros foram tratados com o software ACD/NMR processor academic edition versão 12.01.

As constantes de acoplamento (J) foram mensuradas em Hertz (Hz) e os deslocamentos químicos (δ) em ppm (partes por milhão) utilizando como referência o deslocamento químico do tetrametilsilano (TMS). As abreviaturas seguintes são utilizadas na descrição dos espectros: *s* (singleto), *d* (dubleto), *t* (triplete), *m* (multiplete), *l* (sinal largo).

3.6.1. Compostos isolados de *M. zapota*.

Composto 1: Pó amarelo; $R_f \sim 0.45$ com fluorescência azulada em 366 nm. λ_{max} : 327 nm; RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) 7,56 (1H, d, $J = 15,8$ Hz, H-7), 7,05 (1H, d, $J =$

1,8 Hz, H-2'), 6,96 (1H, dd, $J = 7,9$, 1,8 Hz, H-6'), 6,77 (1H, d, $J = 7,9$ Hz, H-5'), 6,37 (1H, d, $J = 15,8$ Hz, H-8'), 4,20 (1H, m), 3,85 (1H, m), 2,05 (1H, br,s), 1,93 (br,s); HRESITOFMS $[M - H]^-$ calculado para $C_{16}H_{17}O_9$ m/z 353,0872.

Composto 2: Pó amarelo; $R_f \sim 0,65$ com fluorescência alaranjada em 366 nm, $[\alpha]^{25}_D$: -12° (c 0,1 g/100mL, CH_2OH); λ_{max} : 261, 356 nm; RMN 1H (CD_3OD , 500 MHz): δ 3,23 (1H, ddd $J = 9,5$, 5,2, 2,4 Hz, H-5"), 3,38 (1H, dd, $J = 9,5$, 8,8 Hz, H-3"), 3,42 (1H, t, $J = 8,8$ Hz, H-4"), 3,51 (1H, dd, $J = 8,8$, 7,9 Hz, H-2"), 3,62 (1H, d, $J = 11,9$, 5,2 Hz, H-6"), 3,73 (1H, dd, $J = 11,9$, 2,4 Hz, H-6"), 5,26 (1H, d, $J = 7,9$ Hz, H-1"), 6,20 (1H, d, $J = 2,1$ Hz, H-6), 6,38 (1H, d, $J = 2,1$ Hz, H-8), 7,30 (2H, s, H-2' H-6'); HRESITOFMS $[M - H]^-$ m/z 479,0820 (calculada para $C_{21}H_{19}O_{13}$ m/z 479,0826) e $[M + H]^+$ m/z 481,0986 (calculada para $C_{21}H_{21}O_{13}$ m/z 481,0982).

Composto 3: Pó amarelo $R_f \sim 0,8$ com fluorescência alaranjada em 366nm, $[\alpha]^{25}_D$: -61° (c 0,1g/100mL, CH_2OH), λ_{max} : 261, 350 nm; 1H RMN(CD_3OD 500 MHz): δ 0,96 (3H, d, $J = 6,1$, H-6"), 3,52 (1H, dd $J = 9,2$, 6,1 Hz, H-5"), 3,34 (1H, t, $J = 9,2$ Hz, H-4"), 3,79 (1H, dd, $J = 9,2$, 3,0 Hz, H-3"), 4,22 (1H, dd, $J = 3,0$, 1,2 Hz, H-2"), 5,32 (1H, d, $J = 1,2$ Hz, H-1"), 6,20 (1H, d, $J = 1,8$ Hz, H-6), 6,36 (1H, d, $J = 1,8$ Hz), 6,95 (2H, s, H-2', H-6'). ^{13}C RMN (CD_3OD , 125 MHz): 179,58 (C-4), 166,55 (C-7), 163,15 (C-5), 159,34 (C-2), 158,55 (C-9), 146,84 (C-3', C-5'), 137,91 (C-4'), 136,25 (C-3), 121,91 (C-1'), 109,55 (C-2', 6'), 105,67 (C-10), 103,60 (C-1"), 100,00 (C-6), 94,83 (C-8), 73,34 (C-4"), 72,11 (C-3"), 72,00 (C-5"), 71,87 (C-2"), 17,64 (C-6"). HRESITOFMS $[M - H]^-$ m/z 463,0877 (calculado para $C_{21}H_{19}O_{12}$ m/z 463,0877) e $[M + H]^+$ m/z 465,1032 (calculado para $C_{21}H_{21}O_{12}$ m/z 465,1033).

Composto 4: Pó amarelo; $R_f \sim 0,85$ com fluorescência amarela em 366 nm $[\alpha]^{25}_D$: -58° (c 0,1 g/100mL, CH_2OH), λ_{max} : 263, 337 nm. 1H RMN (CD_3OD 500 MHz): δ 0,95 (3H, d, $J = 5,7$, H-6"), 3,32 (m, H-5"), 3,33 (m, H-4"), 3,75 (1H, dd $J = 9,2$, 3,5 Hz, H-3"), 3,88 (3H, s, 4'-OCH₃), 4,22 (1H, dd, $J = 3,5$, 1,9 Hz, H-2"), 5,30 (1H, d, $J = 1,9$ Hz, H-1"), 6,13 (1H, d, $J = 2,2$ Hz, H-6), 6,27 (1H, d, $J = 2,2$ Hz), 6,87 (2H, s, H-2', H-6'). ^{13}C RMN (CD_3OD , 125 MHz): 168,27 (C-7), 158,77 (C-2), 152,28 (C-3', C-5'), 139,28 (C-4'), 127,42 (C-1'), 109,91 (C-2', C-6'), 103,63 (C-1"), 100,65 (C-6), 95,85 (C-8), 73,40 (C-5"), 72,27 (C-4"), 72,15 (C-3"), 72,05 (C-2"), 61,04 (4'-OCH₃), 17,86 (C-6").

HRESITOFMS $[M - H]^-$ m/z 477,1039 (calcd para $C_{22}H_{21}O_{12}$ m/z 477,1033) e $[M + H]^+$ m/z 479,1180 (479,1190 calculado para $C_{22}H_{23}O_{12}$ m/z).

3.6.2. Compostos isolados de *M. commersonii*.

Composto 1': Pó branco amorfo. RMN 1H (CD_3OD , 500 MHz): δ 0,99 (3H, s, H-12), 1,03 (3H, s, H-11), 1,29 (3H, d, $J = 6,7$ Hz, H-10), 1,98 (3H, d, $J = 1,2$ Hz, H-13), 2,05 (1H, d, $J = 16,4$ Hz, H-2 α), 2,48 (1H, d, $J = 17,1$ Hz, H-2 β), 2,69 (1H, d, $J = 9,2$ Hz, H-6), 3,15 – 3,45 (4H, m, H-2', H-3', H-4', H-5'), 3,63 (1H, dd $J = 11,6, 6,1$ Hz, H-6' β), 3,85 (1H, dd, $J = 11,6, 2,4$ Hz, H-6' α), 4,29 (1H, d $J = 7,9$ Hz, H-1'), 4,48 (1H, m(q) $J = 6,7$, H-9), 5,58 (1H, dd, $J = 15,3, 7,3$ Hz, H-8), 5,75 (1H, dd, $J = 15,3, 9,2$ Hz, H-7), 5,89 (1H, sl, H-4). HRESITOFMS: $m/z = 371,2062$ $[M+H]^+_{exp}$ (com $m/z = 371,2070$ $[M+H]^+_{calc}$ para $C_{19}H_{31}O_7$ e em $m/z = 415,1974$ $[M+FA-H]^+_{exp}$ com $m/z = 415,1968$ $[M+FA-H]^+_{calc}$ com fórmula bruta $C_{20}H_{31}O_9$).

Descrição para a aglicona dos compostos 2', 3', 4' e 5'

RMN 1H (CD_3OD , 500 MHz): δ 0,91 (3H, s, H-29), 0,94 (3H, s H-30), 1,07 (3H, s, H-26), 1,14 (3H, s, H-27), 1,14 (1H, m, H-19), 1,15 (1H, m, H-1), 1,18 (1H, m, H-15), 1,22 (1H, m, H-21), 1,34 (3H, s, H-24), 1,34 (1H, s, H-5), 1,39 (1H td, $J = 14,0; 3,6$ Hz, H-21), 1,53 (1H, brd, $J = 14$ Hz, H-7), 1,55 (1H, dd, $J = 11,0, 3,0$ Hz, H-22), 1,62 sl (1H, H-9), 1,62 (1H, m, H-16), 1,63 (1H, m H-15), 1,70 (1H, m, H-22), 1,73 (1H, t $J = 13,4$, H-19), 1,76 (1H, m, H-7), 1,97 (1H, dt, $J = 17,7, 4,8$ Hz, H-11), 2,00 (1H, dd, $J = 14,0, 2,0$ Hz, H-1), 2,04 (1H, m, H-16), 2,12 (1H, ddd, $J = 18,0, 11,6, 3,6$ Hz, H-11), 2,88 (1H, dd, $J = 13,4, 3,6$ Hz, H-18), 3,44 (1H, d, $J = 11,5$ Hz, H-23), 3,58 (1H, s, H-3), 3,75 (1H, d, $J = 11,6$ Hz, H-23), 4,33 (1H, m, H-2), 4,49 (1H, m, H-6), 5,33 (1H, bt $J = 3,6$ Hz, H-12). ^{13}C RMN (CD_3OD , 125 MHz): 16,5 (C-24), 19,1 (C-26), 19,4 (C-25), 24,0 (C-16), 24,1 (C-30), 24,8 (C-11), 26,5 (C-27), 29,17 (C-15), 31,7 (C-20), 33,4 (C-22), 33,6 (C-29), 35,0 (C-21), 37,2 (C-10), 39,9 (C-8), 41,5 (C-7), 43,0 (C-18), 43,8 (C-14), 44,2 (C-4), 46,7 (C-1), 47,3 (C-19), 48,5 (C-17), 49,1 (C-5), 49,7 (C-9), 65,5 (C-23), 68,6 (C-6), 71,4 (C-2), 83,8 (C-3), 124,3 (C-12), 144,3 (C-13), 178,1 (C-28).

Composto 2': Pó branco amorfo. $[\alpha]^{25}_D$: -41° (c 0,1g/100mL, CH₂OH), HRESITOFMS: $m/z = 1399,6382$ [M+FA-H]⁻_{exp.} (com $m/z = 1399,6382$ [M+FA-H]⁻_{calcd}) com fórmula bruta de C₆₃H₁₀₃O₃₁.

Composto 3': Pó amorfo. $[\alpha]^{25}_D$: $-27,5^\circ$ (c 0,1g/100mL, CH₂OH), HRESITOFMS: aducto [M-H₂O+H]⁺_{exp.} com $m/z = 1483,6919$ (com $m/z = 1483,6957$ [M-H₂O+H]⁺_{calcd}) resulta na fórmula bruta C₆₉H₁₁₁O₃₄.

Composto 4': Pó branco amorfo. $[\alpha]^{25}_D$: -50° (c 0,1g/100mL, CH₂OH), HRESITOFMS: $m/z = 1413,6597$ [M+FA-H]⁻_{exp.} (com $m/z = 1413,6558$ [M+FA-H]⁻_{calcd}) resultando na fórmula bruta C₆₅H₁₀₅O₃₃.

Composto 5': Pó branco. $[\alpha]^{25}_D$: $-15,5^\circ$ (c 0,1g/100mL, CH₂OH), HRESITOFMS com pico de íon pseudomolecular em $m/z = 1205,5983$ [M-H₂O+H]⁺_{exp.} (com $m/z = 1205,5955$ [M-H₂O+H]⁺_{calcd}) com fórmula bruta C₅₈H₉₄O₂₆.

4. Testes biológicos com as espécies *M. zapota* e *M. commersonii*

4.1. Avaliação da atividade anti-helmíntica *in vitro* contra *Strongyloides venezuelensis*

4.1.1. Parasitas e animais

Nesse estudo foram empregadas as formas adultas (fêmeas partenogenéticas triploides) de *S. venezuelensis* isoladas do roedor *Bolomys lasiurus* e mantidas em *Rattus norvegicus* Wistar (machos de 30 dias) no Departamento de Biologia Animal, IB – UNICAMP. Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA/Unicamp, protocolo nº 4089-1).

As larvas filarioides de *S. venezuelensis*, obtidas das fezes dos ratos por coprocultura e isoladas pelo método Rugai (RUGAI, E., MATTOS, T., BRISOLA, 1954), foram inoculadas (injeção subcutânea) em ratos SPF machos com trinta dias de idade. Foram utilizadas cerca de 2000 larvas (L3) a cada infecção. Para obtenção das formas adultas os ratos foram eutanasiados (concussão) e cerca de 15 cm do intestino delgado foi seccionado e removido 15 dias após a infecção, cortado longitudinalmente e incubado em meio RPMI por 2 horas a 37 °C, promovendo a saída dos parasitas do interior do epitélio intestinal para o meio de cultura.

4.1.2. Teste de atividade anti-helmíntica *in vitro*

Para garantir a solubilização no meio de cultura, todas as amostras foram primeiramente dispersas em polivinilpirrolidona PVP-K30 (Synth, São Paulo, Brasil) na proporção de 1:4 (amostra: polímero) conforme o método descrito por SANTOS (2013). A solução de PBS 2% foi utilizada como veículo de solubilização das amostras dispersas em PVP. Os testes foram realizados em placas de 24 poços com um volume de 2000 µL/poço.

As formas adultas de *S. venezuelensis* foram depositadas em placas de cultura (dois exemplares em cada poço) contendo 2 mL de meio RPMI 1640 Cultilab (São Paulo, Brasil) suplementado com 50 µg/mL de gentamicina e 2,5 µg/mL de anfotericina B. Os meios foram acrescidos de diferentes concentrações dos extratos, frações e compostos isolados (50, 100, 200 e 400 µg/mL) e as placas mantidas a 37 °C em atmosfera de CO₂ a 5% durante 72 horas.

A presença ou ausência de motilidade dos parasitas foram observadas por dois minutos utilizando microscópio invertido Leica DM500 (Wetzlar, Alemanha) em intervalos regulares de 6, 24, 48 e 72 horas. Curvas de sobrevida foram delineadas no software Graph Pad Prism 5.0 (San Diego, CA, EUA), a partir da comparação entre as concentrações das amostras testadas e o controle negativo. A integridade da cutícula dos parasitas também foi observada.

4.1.3. Análises estatísticas

Cada ensaio de atividade anti-helmíntica foi conduzido em triplicata em três experimentos independentes. A significância estatística foi determinada pelo teste de Mantel-Cox. As diferenças entre as curvas de sobrevida foram consideradas estatisticamente significantes quando o valor de p foi menor que 0,001.

4.1.4. Observação de alterações morfológicas

A presença de alterações morfológicas na superfície cuticular dos parasitas foi observada após 72 horas de incubação em microscópio invertido Leica DM500 (Wetzlar, Alemanha) acoplado à câmera fotográfica Leica EC4.

4.2. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro*

4.2.1. Microrganismos

As atividades antibacteriana e antifúngica dos extratos, frações iniciais e compostos isolados de *M. zapota* e *M. commersonii* foram avaliadas contra três patógenos humanos de referência. Uma bactéria gram positiva (*Staphylococcus aureus*), uma levedura (*Candida albicans*) e um fungo filamentoso (*Trichophyton rubrum*) (Tabela 2). Os patógenos foram mantidos em meio inclinado em tubos de ensaio (Müller Hinton para bactéria e Saboround para fungo e levedura). As cepas foram repicadas durante as semanas de testes e em seguida incubadas e conservadas a 37 °C.

Tabela 2: Microrganismos testados no estudo.

Cepa	Origem	Código	Referência GenBank
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC	2921	–
<i>Candida albicans</i>	ATCC	1021	–
<i>Trichophyton rubrum</i>	Isolado clínico*	SNB-TR1	KF360235

*A cepa proveniente de isolado clínico foi identificada e fornecida por Philippe Loiseau da Universidade Paris-Sud. A espécie foi confirmada por sequenciamento e as sequências ITS foram depositadas na base de dados GenBank (NCBI).

4.2.2. Preparo do inóculo

Inóculos dos microrganismos foram preparados por meio de suspensão de uma colônia (para bactérias e leveduras) ou de parte visível do micélio (para o fungo filamentoso) em água destilada estéril. A suspensão foi ajustada até atingir uma densidade óptica de 0,5 McFarland (correspondente a $1-2 \cdot 10^8$ UFC/mL) e em seguida diluído no meio de cultura (Muller Hinton ou RPMI) numa proporção de 1:20 (v/v, para a bactéria), 1:1.000 (v/v, levedura) e 1:10 (v/v, para o dermatófito).

4.2.3. Avaliação da atividade antimicrobiana por meio do teste de microdiluição

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada por meio do método da microdiluição, que permite determinar a sensibilidade de um microrganismo à um determinado agente antimicrobiano. O teste indica a concentração mínima inibitória

(MIC, em $\mu\text{g/mL}$) definida como a menor concentração do antimicrobiano na qual este é capaz de inibir o crescimento microbiano visível. Os testes foram realizados de acordo com os protocolos de referência estabelecidos pelo CLSI para testes de susceptibilidade a bactérias, leveduras e fungos filamentosos (CLSI, 2008a, 2008b, 2009).

4.3. Atividade antiproliferativa *in vitro* de extratos frações e compostos isolados de *M. zapota* e *M. commersonii* sobre queratinócitos humanos (HaCaT)

A linhagem celular de queratinócitos humanos (HaCaT) foi obtida da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP. As culturas de reserva e experimentais foram cultivadas num meio contendo 5 mL de RPMI 1640 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, EUA) suplementado com 5% de soro fetal bovino (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, EUA). Uma mistura de penicilina e estreptomicina (1000 U/mL: 1000 $\mu\text{g/mL}$, 10 mL/L RPMI) foi adicionada às culturas experimentais. Em placas de 96 poços as células (100 μL células/poço, densidade de inoculação 4×10^4 células/mL) foram expostas às amostras testadas diluídas em DMSO (0.25–250 $\mu\text{g/mL}$, 100 μL /poço), veículo ou doxorubicina, utilizada como controle positivo (0.25 – 250 $\mu\text{g/mL}$) e incubadas a 37°C, 5% CO_2 por 48 horas. A concentração final de DMSO não afetou a viabilidade celular. Antes (placa T0) e após a adição das amostras (placas T1), as células foram fixadas com ácido tricloroacético a 50% Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e a proliferação celular foi determinada por quantificação espectrofotométrica a 540 nm utilizando sulforrodamina B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). Três medidas foram obtidas no início (T0) e 48 horas após a incubação, para células livres de composto (C) e testadas (T). A proliferação celular foi determinada de acordo com a equação: $100 \times [(T-T_0)/C-T_0]$, para $T_0 < T \leq C$ e $100 \times [(T-T_0)/T_0]$, para $T \leq T_0$. As curvas de proliferação em função da concentração de amostra foram construídas para cada amostra utilizando o software Origin 8.0 (OriginLab Corporation, Inc., Northampton, MA, USA). O valor de TGI (concentração na qual ocorre inibição total da proliferação celular) foi determinado a partir da regressão não linear (sigmoidal) das curvas obtidas (DA CUNHA et al., 2013; DENNY et al., 2008; MONKS et al., 1991; SHOEMAKER, 2006).

CAPÍTULO 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO REFERENTES À ESPÉCIE *Manilkara zapota* (L.) P. Royen

1. Obtenção dos extratos e frações

As amostras obtidas na extração e no fracionamento inicial das folhas de *M. zapota* são apresentadas na Tabela 3. O EEMz obtido por turbolização apresentou rendimento de 10,71% e seu fracionamento pelo mesmo método utilizando acetato de etila forneceu, após secagem, as frações FMePMz e FMaPMz com rendimentos de 54,16 e 38,13%, respectivamente. A FMaPMz foi purificada por 2 métodos: (1) filtração em poliamida seguida de SPE e HPLC preparativa (500 mg da amostra) e (2) Cromatografia Flash seguida de separação em coluna preparativa, para 2 g da fração. Foram obtidos os compostos **1** (3,5 mg), **2** (0,7 mg) **3** (13,8 mg) e **4** (4,46 mg). Os fluxogramas correspondentes às etapas de extração, fracionamento e purificação podem ser observados nas Figuras 6, 7 e 8 no Capítulo 2.

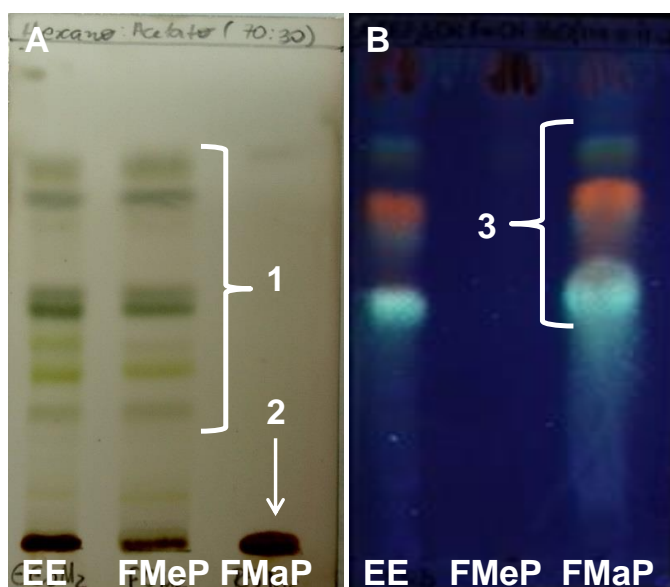
Tabela 3: Características dos extratos e frações obtidos no processo de fracionamento e purificação das folhas de *M. zapota*.

Amostra	Material precursor/ massa (g)		Massa final (g)	Rendimento (%)
EEMz	Folhas	900	96,47	10,71
EHxAcMz_{soxhlet}	Folhas	100	6,62	6,62
EEMz_{soxhlet}	Folhas	100	5,64	5,64
FMePMz	EEMz	30	16,2	54,16
FMaPMz	EEMz	30	11,4	38,13
FMeOHMz	FMaPMz	0,5	0,32	65,12
FIV_{SPE}	FMeOHMz	0,32	0,20	62,16

A observação dos compostos presentes no extrato etanólico e frações de *M. zapota* foi feita por análises de CCD (Figura 9). Na cromatoplaça A, as amostras foram eluídas com hexano: acetato (70:30) e reveladas com anisaldeído. A FMeP mostrou-se enriquecida em compostos de média e baixa polaridade presentes no EEMz enquanto que a FMaP apresentou compostos retidos no ponto de aplicação da amostra (Figura 9A).

A placa B (Figura 9b), foi eluída com a fase móvel polar comumente utilizada para a observação de compostos fenólicos. O EE e a FMaP mostraram bandas com fluorescências de cor azul, laranja e amarela, indicativas da presença dos compostos supracitados, enquanto a FMeP não apresentou fluorescência. A análise por CCD mostrou que o fracionamento do extrato etanólico por turbolização com acetato de etila apresentou eficiência na separação inicial dos compostos de diferentes polaridades.

Figura 9: Cromatogramas referentes ao fracionamento do extrato etanólico de *M. zapota*.



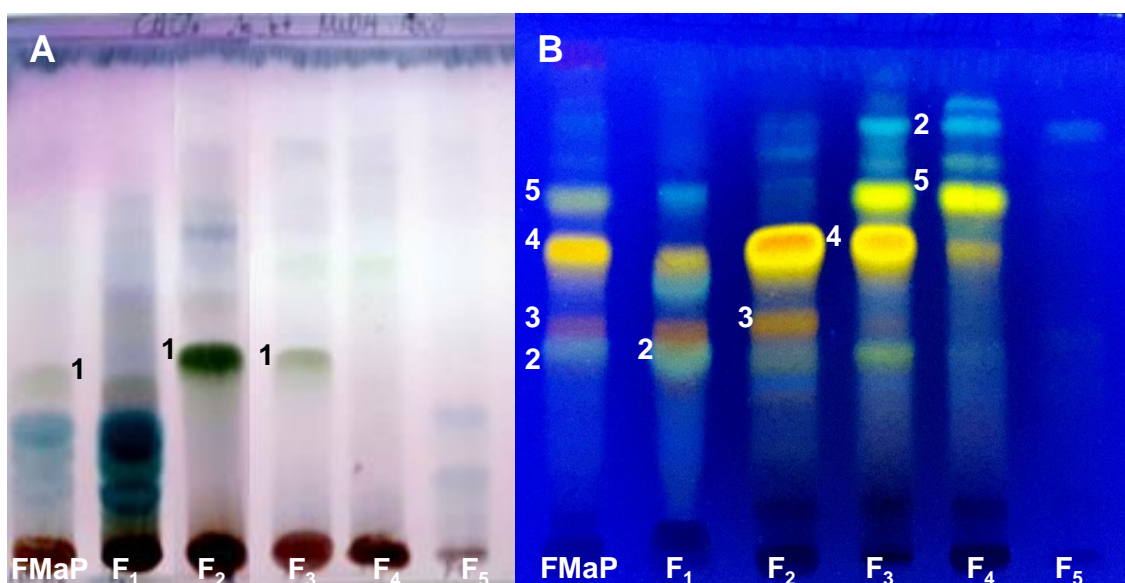
Placa A: Fase móvel: hexano: acetato de etila (70:30), revelador: solução de anisaldeído (1): bandas correspondentes aos compostos de média e baixa polaridade (2): Compostos de FMaP retidos no ponto de aplicação; **Placa B:** fase móvel: acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100:11:11:26) Revelador: NP e macrogol e sob luz UV- 366nm (3): bandas correspondentes aos compostos de maior polaridade.

As análises por CCD da FMaP e suas subfrações (F₁ a F₅) obtidas por cromatografia Flash foram feitas com o objetivo de avaliar a presença de saponinas (placa A) e compostos fenólicos (placa B) (Figura 10).

A análise da placa A sugeriu a presença de saponinas nas frações F₁, F₂ e F₃ a partir da presença bandas cinza-esverdeadas (WAGNER; BLADT, 1996). A placa B apresenta bandas com fluorescência azuladas com RF inferior a 0,5 F₁ (1) e

com RF superior a 0,5 nas frações F₃ e F₄ (1) característica de ácidos fenólicos . A banda com fluorescência amarelo–alaranjada (2, 3 e 4) nas frações de F₁ e F₄ evidenciam a presença de compostos fenólicos, principalmente flavonoides (WAGNER; BLADT, 1996).

Figura 10 Cromatogramas referentes às frações obtidas por cromatografia Flash (F₁, F₂, F₃, F₄ e F₅) das folhas de *M. zapota* (FMaP).

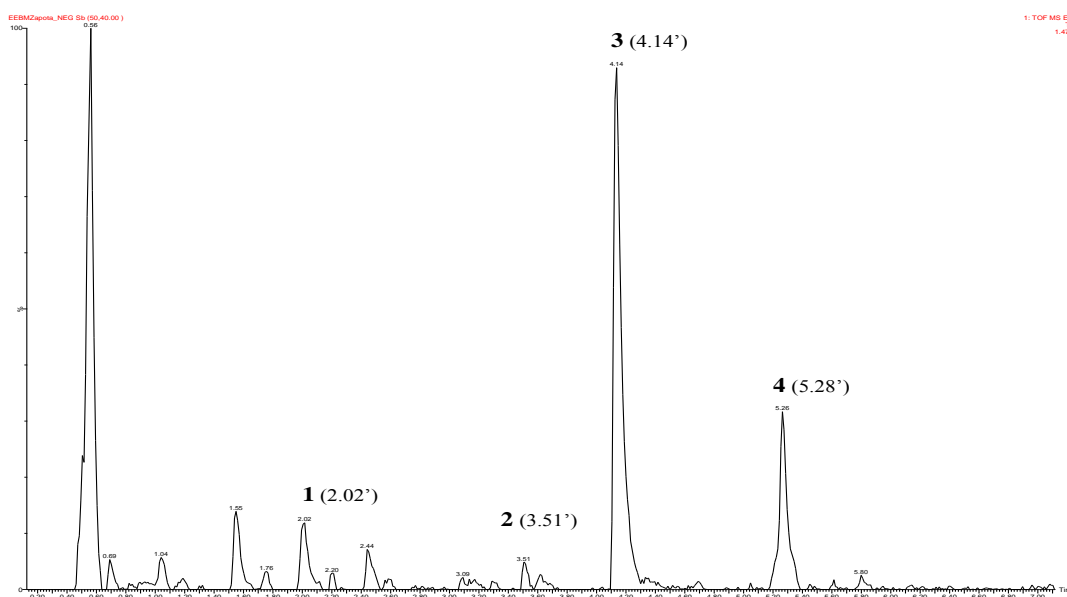


Placa **A**: Fase móvel: clorofórmio: ácido acético: metanol: água (60:32:12:8) revelador: solução de anisaldeído (1) bandas indicativas da presença de saponinas; Placa **B**: Fase móvel: acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100:11:11:26) Revelador: NP e macrogol e sob luz UV- 366nm (2): bandas correspondentes a ácidos fenólicos; (3), (4) e (5): bandas indicativas da presença de flavonoides.

2. Análise e elucidação estrutural dos compostos isolados da fração de maior polaridade (FMaPMz)

Através da análise por UPLC da FMaPMz foi possível identificar os compostos **1**, **2**, **3** e **4** que apresentaram os tempos de retenção de 2,02, 3,51, 4,14 e 5,28 min, respectivamente (Figura 11) Em seguida as estruturas dos compostos foram determinadas com base em experimentos de RMN uni e bi dimensionais (¹H, ¹³C, COSY, HSQC e HMBC), dados de massa de alta resolução, análises de rotação óptica e comparação desses dados com a literatura (Anexos de 3 a 16).

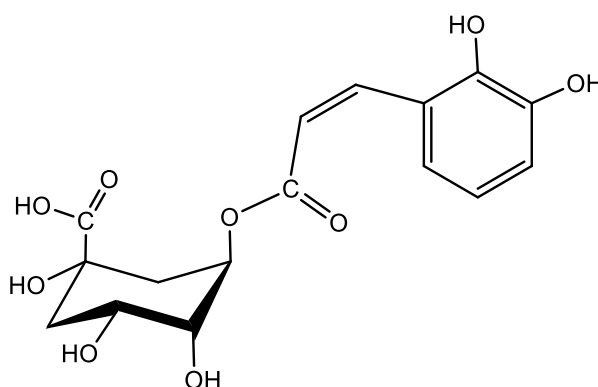
Figura 11: Cromatograma do EEMz com os picos correspondentes aos compostos identificados na FMaPMz.



UPLC-HRESITOFMS; Coluna bypass

O composto **1** ($t_R = 2,02$ min, UPLC) apresentou fórmula molecular $C_{16}H_{18}O_9$ com respectiva massa de 354 obtida a partir da análise da massa de alta resolução com extração do íon em modo negativo $[M - H]^-$ m/z 353,0872, sendo identificado como ácido clorogênico(AC). A estrutura do composto foi confirmada pelos dados de RMN (Figura 12). Na análise por HPLC-DAD a comparação entre os espectros de UV do padrão de ácido clorogênico e do pico cromatográfico correspondentes no EEMz, ambos com o mesmo tempo de retenção, mostrou tratar-se do mesmo composto com $\lambda_{\text{máx}}$ de 327 nm.

Figura 12: Estrutura do composto **1** isolado de *M. zapota*.

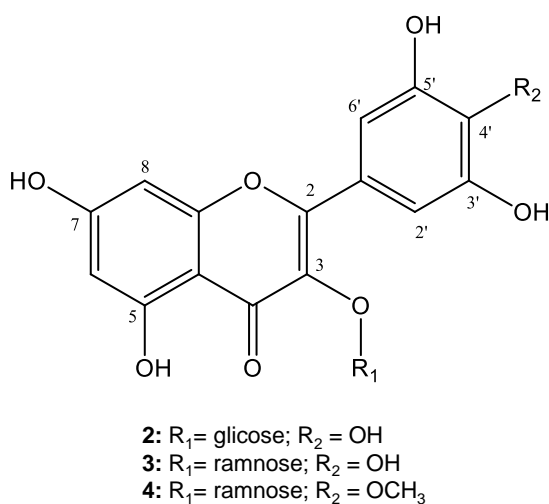


Os dados de elucidação estrutural confirmam os resultados obtidos por Fayek e colaboradores (2013), que isolaram este composto de frutos de *M. zapota*. Em trabalhos anteriores o ácido clorogênico também foi identificado em frutos e sementes de *M. zapota* (KANLAYAVATTANAKUL; LOURITH, 2011; MA et al., 2003; SHUI; WONG; LEONG, 2004; WANG et al., 2012).

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C das substâncias **2**, **3** e **4** permitiram inferir que elas apresentam núcleo base semelhante e pertencem à classe dos flavonoides. O par de dubletos em δ 6,18 ($\pm 0,8$) ($J = 2,0 \pm 0,5$ 1H, H-6) e δ 6,35 ($\pm 0,8$) ($J = 2,1 \pm 0,4$ 1H, H-8) foi atribuído ao anel A 5,7, 9, 10-tetrasubstituído. Os sinais em δ 177,5, $158,7 \pm 0,5$ e 136,2 atribuídos aos carbonos C-4, C-2 e C-3 evidenciam tratar-se compostos da subclasse flavonóis (Figura 13).

Os deslocamentos de δ_c 137,9, 146,8 e 146,8 foram atribuídos aos C-4', C-3' e C-5' respectivamente, além da presença de dois singletos em δ 6,95 ($\pm 0,8$) demonstrando um esqueleto do tipo flavonol, cujo anel B encontra-se 1', 3', 4', 5'-tetrassubstituído. Esses dados permitiram atribuir a estrutura do núcleo base dos compostos isolados à da miricetina (Figura 13). Esses dados corroboram aqueles obtidos por Shen, Chen e Lee (2009).

Figura 13: Esqueleto básico dos compostos **2**, **3** e **4** isolados de *M. zapota*



Adicionalmente, os sinais de δ_c $103,6 \pm 0,3$ com prótons correspondentes em δ_H $5,30 (\pm 0,9)$ evidenciam a presença de um açúcar como substituinte. A posição do açúcar em C-3 foi confirmada por análises de HMBC com o acoplamento

do próton anomérico (δ 5,30 \pm 0,9) com o C-3 da aglicona (δ 136,2). Dados semelhantes foram observados por Samy e colaboradores (2014).

Quanto aos açúcares ligados a C-3 das agliconas, observou-se no composto **2** a presença de uma unidade β -D-glicopiranosídica. A atribuição da unidade de açúcar como glicose baseou-se nas altas constantes de acoplamento (J_{HH}) envolvendo cada par consecutivo de prótons H-1, H-2, H-3, H-4 e H-5 do açúcar variando entre 8,8 e 11,9 Hz, sendo esta uma característica de prótons em posição axial (REGASINI et al., 2008). As altas constantes de acoplamento também determinaram a configuração β para a glicose identificada.

Altos valores de constantes também são encontrados em galactosídeos, porém nesse caso, o valor da constante de acoplamento entre os prótons H-3 e H-4 é menor, $J \sim 4,0$ Hz devido à posição equatorial de H-4 (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009), no entanto o alto valor de J_{HH} entre os prótons H-3 e H-4 (8,8 Hz) em nosso estudo confirma não se tratar de um 3-O-galactosídeo e sim de um 3-O-glicopiranosídeo.

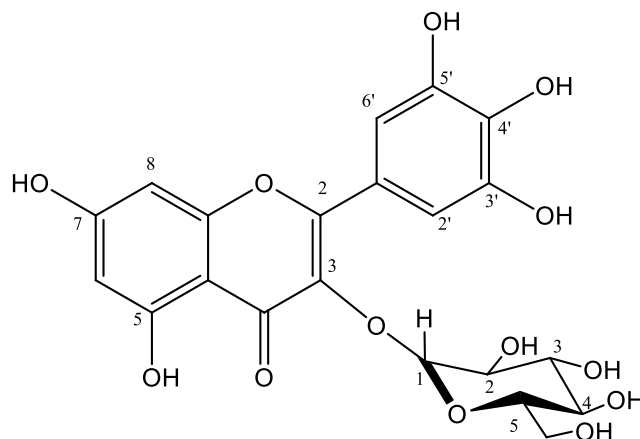
O espectro de massas HRESITOFMS do composto **2** apresentou picos de íon pseudomoleculares em $[M + H]^+$ m/z 481,0986 (calculada para m/z 481,0982 com fórmula bruta $C_{21}H_{21}O_{13}$) e em modo negativo $[M - H]^-$ m/z 479,0820 (calculada para $C_{21}H_{19}O_{13}$ com m/z 479,0826). Esses resultados permitiram a determinação da fórmula molecular $C_{21}H_{19}O_{13}$ com massa de 480.

A partir dos dados de RMN e de massas de alta resolução este composto foi identificado como miricetina-3-O- β -D-glicopiranosídeo (Figura 14) (TAKINO; IMAGAWA; YOSHIDA, 1962). A elucidação estrutural do composto **2** ($C_{21}H_{19}O_{13}$) foi reportada em estudos prévios (AROT; MIDIWO; KRAUST, 1996; SCHARBERT; HOLZMANN; HOFMANN, 2004). A literatura reporta a presença de miricetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo e miricetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo em espécies da família Sapotaceae.

Observando os dados de RMN de 1H e ^{13}C dos compostos **3** e **4** foi possível concluir que ambos apresentavam a mesma unidade osídica ligada à C-3. O sinal em δ_C 17,6 \pm 0,2 atribuído ao carbono metílico C-6 do açúcar e o conjunto de sinais em δ_C 71,8 (\pm 0,2), 72,1 (\pm 0,4), 73,3 (\pm 0,1), 72,0 (\pm 0,2) permitiram classificá-lo como ramnose. O espectro de RMN 1H mostrou a presença de um dubleto em δ_H 5,30 \pm 0,2 que por sua vez, foi atribuído ao próton anomérico H-1, cujas constantes

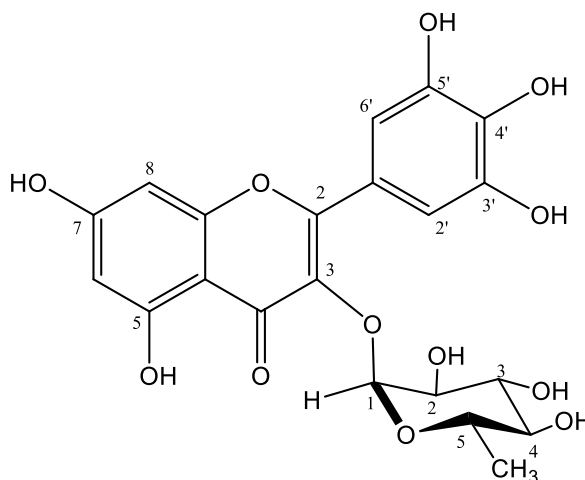
de acoplamento de $1,2 \pm 0,7$ Hz determinaram a configuração α para a ramnose nos dois compostos (REGASINI et al., 2008).

Figura 14: Estrutura do composto **2** isolado de *M. zapota*.



O composto **3** apresentou fórmula molecular $C_{21}H_{19}O_{13}$ com massa de 464, partindo da fórmula bruta $C_{21}H_{19}O_{12}$ resultante do aducto em modo negativo $[M - H]^-$ m/z 463,0877 (calculado para $C_{21}H_{19}O_{12}$ m/z 463,0877) e $[M + H]^+$ m/z 465,1032 (calculado para $C_{21}H_{21}O_{12}$ m/z 465,1033) em modo positivo. Assim, esse composto foi identificado como miricetina-3-O- α -L-ramnopiranosídeo também conhecido como miricitrina (Figura 15) Os dados são consistentes com aqueles reportados por Fayek et al (2012) que isolaram este composto de folhas de *M. zapota* e com estudos anteriores que reportam a sua presença em outras espécies vegetais (BRACA et al., 2003; FOSSEN et al., 1999; SHEN; CHEN; LEE, 2009).

Figura 15: Estrutura do composto **3** isolado de *M. zapota*.

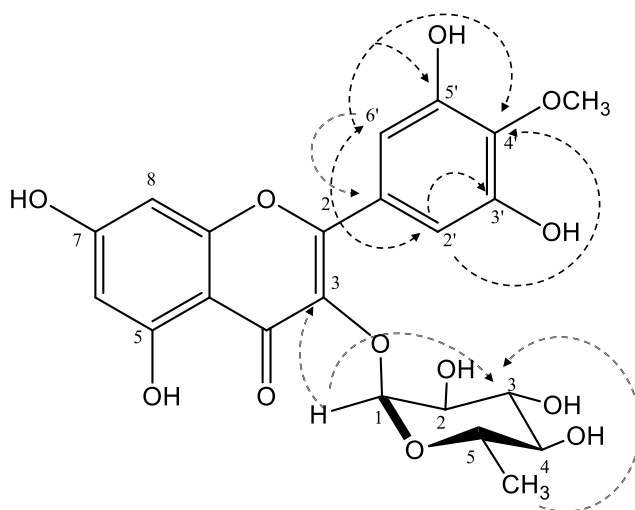


A partir dos dados de massa de alta resolução nos quais $[M - H]^-$ experimental de m/z 477,1039 (com calculado para $C_{22}H_{21}O_{12}$ m/z 477,1033) e $[M + H]^+$ experimental de m/z 479,1180 com m/z 479,1190 calculado para $C_{22}H_{23}O_{12}$ m/z obteve-se a fórmula molecular do composto **4** correspondente a $C_{22}H_{22}O_{12}$ com massa de 478.

Além dos dados de 1H RMN já atribuídos foi possível identificar um sinal característico da presença de um grupo metoxila (OCH_3) em δ 3,88. A localização deste grupo foi determinada pelos dados de HMBC que mostraram a sua correlação com C-4' (δ 139,28), além das correlações dos dois prótons H-2' e H-6' (singleto em 6,87 ppm) com o mesmo carbono, (MAHMOUD et al., 2001) o que confirma a posição do metil éter em C4'.

Esse composto foi identificado como miricetina-3-O-4'-metil-eter-3-O- α -L-ramnopiranosídeo, também conhecido como mearnssetin-3-O- α -L-ramnopiranosídeo (mearnsitrina), pela comparação dos dados experimentais de HRMS e RMN para o composto **4** (Figura 16) com aqueles apresentados na literatura (HARBORNE, 1967; JUNG et al., 2015; MAMDOUH et al., 2014; SEIDEL; BAILLEUL; WATERMAN, 2000).

Figura 16: Chave de correlação HMBC para o composto **4** isolado de *M. zapota*.



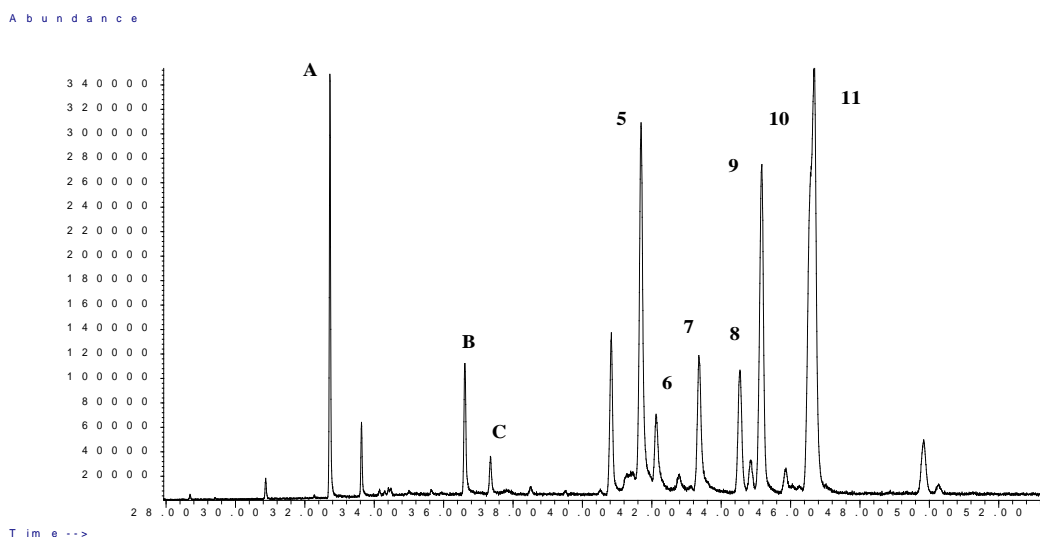
Este é o primeiro estudo a reportar a presença de ácido clorogênico, miricetina-3-glicopiranosídeo e mearnsitrina em folhas de *M. zapota*.

3. Avaliação da composição químicas da FMePMz por CG-EM

A partir das análises por CG-EM observou-se a predominância de compostos triterpênicos pentacíclicos com padrão de fragmentação típico de esqueletos das séries ursano e oleano, com tempos de retenção entre 40 e 47 min, totalizando 75% da fração FMePMz (Figura 17).

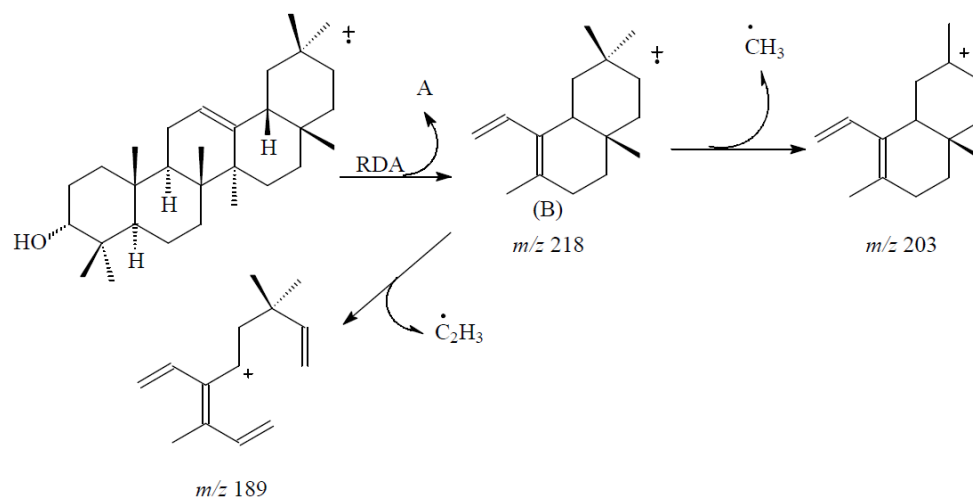
Os estudos do padrão de fragmentação de triterpenos pentacíclicos definem que, na presença de uma dupla ligação na posição 12 a fragmentação mais característica ocorre via reação Retro-Diels-Alder (RDA). Esse padrão é frequente em triterpenos das séries de olean-12-enos e ursan-12-enos com fragmento base em m/z 218 e a presença dos fragmentos em m/z 203 e 189. (OYO-ITA et al., 2010; VILEGAS et al., 1997; ZANON et al., 2008). A abundância dos picos m/z 203 e 189 é determinante na diferenciação entre essas duas séries de compostos (BUDZIKIEWICZ; WILSON; DJERASSI, 1963; OYO-ITA et al., 2010; SILVA, 2007)

Figura 17: Cromatograma (CG-EM) expandido (28 a 52 min) da fração de menor polaridade das folhas de *M. zapota*.



Para compostos com fragmentação característica da série olean-12-eno, o fragmento em m/z 203 (m/z 218 – CH_3) apresenta-se mais abundante quando comparado ao m/z 189. Isso ocorre porque a perda do grupo metila (C-20) origina um íon terciário (m/z 203) que é mais estável do que o íon secundário em m/z 189 (OGUNKOYA, 1981) (Figura 18).

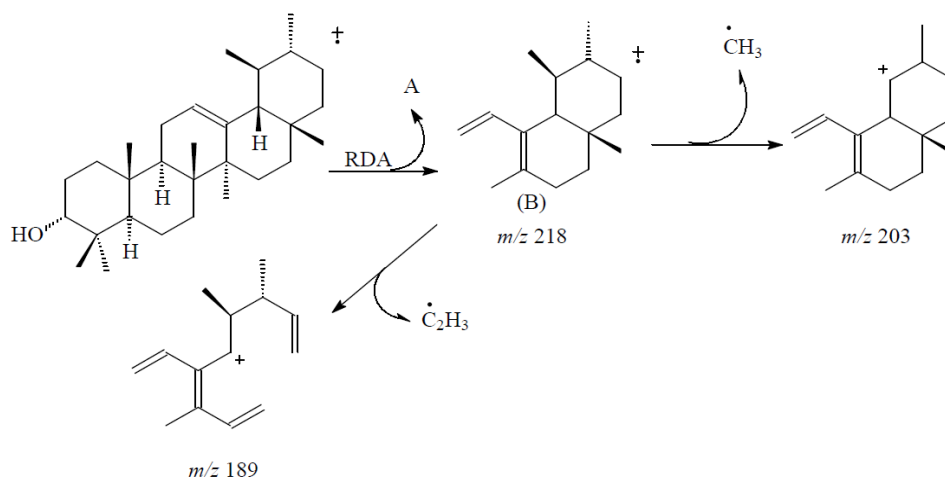
Figura 18: Proposta de fragmentação de compostos da série olean-12-eno via reação Retro-Diels-Alder (RDA).



Adaptado de Silva (2007).

Para os compostos pertencentes à séries dos ursan-12-enos, os fragmentos m/z 203 e 189 apresentam abundância similar. Isso é devido à formação cátion em m/z 203 (m/z 218- CH_3) decorrente da perda da metila em C-19 que origina um íon secundário em m/z 189. Dessa forma, os dois fragmentos formados apresentam estabilidade semelhante (OGUNKOYA, 1981) (Figura 19).

Figura 19: Proposta de fragmentação de compostos da série ursan-12-eno via reação Retro-Diels-Alder (RDA).



Adaptado de Silva (2007).

Na Tabela 4 estão apresentados os compostos identificados na FMePMz a partir de seus padrões de fragmentação e comparação com dados da biblioteca NIST 11. A presença de hidrocarbonetos de cadeia longa e esteróis em partes aéreas de *M. zapota* já foi demonstrada em trabalhos anteriores (FAYEK et al., 2012; MISRA; NIGAM; MITRA, 1969, 1970) Isso foi confirmado em nosso trabalho pela presença dos compostos A, B e C.

O composto **5** apresentou pico base em m/z 204, acompanhado dos íons m/z 189 e 177, característicos do composto germanicol (olean-18-en-3 β -ol) (OYO-ITA et al., 2010) (Anexo 20). Os picos em m/z 218; 203 e 189 oriundos da fragmentação do tipo RDA do anel C foram observados nos compostos **6** e **7**, identificados como β e α -amirina, respectivamente (Anexos 21 e 22).

Tabela 4: Análise CG-EM da composição química da fração de menor polaridade de folhas de *M. zapota*.

Tipo	TR ^a (min)	Composto ^b	m/z	Fórmula molecular	Composição relativa ^c (%)
A	32,76	Esqualeno	410	C ₃₀ H ₅₀	5.94
B	36,61	n-hentriacontano	436	C ₃₁ H ₆₄	2.83
C	37,35	α -tocoferol	430	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	0.86
5	41,69	Germanicol	426	C ₃₀ H ₅₀ O	14.79
6	42,13	β – amirina	426	C ₃₀ H ₅₀ O	3.89
7	43,46	α – amirina	426	C ₃₀ H ₅₀ O	6.54
8	44,54	Acetato de germanicol	468	C ₃₂ H ₅₂ O	4.84
9	45,15	Acetato de β – amirina	468	C ₃₂ H ₅₂ O ₂	13.90
10	46,59	Acetato de α – amirina	468	C ₃₂ H ₅₂ O ₂	31.04
11	46,60	Acetato de lupeol	468	C ₃₂ H ₅₂ O ₂	

^a Tempo de retenção

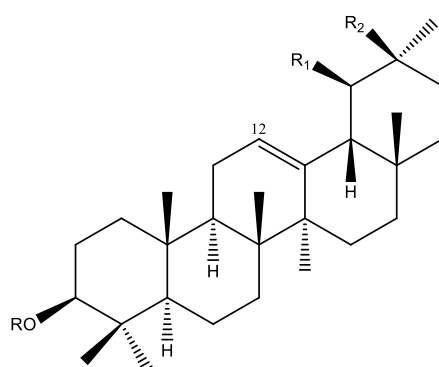
^b Compostos listados em ordem de eluição na coluna capilar HP-5MS.

^c Porcentagem baseada na área do pico.

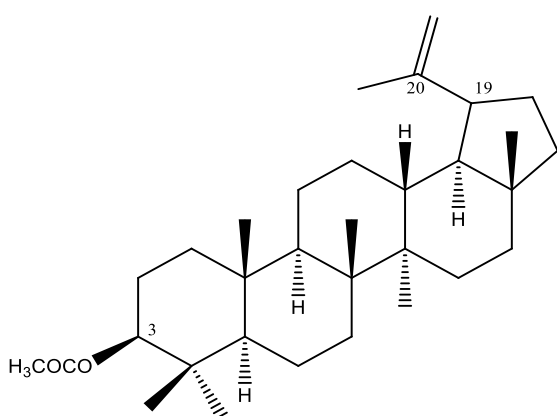
Segundo Elias et al. (1997), os espectros de massa dos ésteres triterpênicos refletem o padrão de fragmentação do esqueleto principal com íons menores a partir da porção ácida adicional. Assim, a fragmentação do composto **8**

(Anexo 23) corresponde àquela esperada para o acetato de germanicol, (m/z 468) com os fragmentos característicos do germanicol (m/z 204 e 169) e a presença dos fragmentos m/z 453 e 408 que confirmam a perda dos grupos metil e acetil, respectivamente, além da presença do fragmento em m/z 43 (COCH_3) (OYO-ITA et al., 2010). As estruturas dos compostos identificados na FMePMz estão apresentadas na Figura 20.

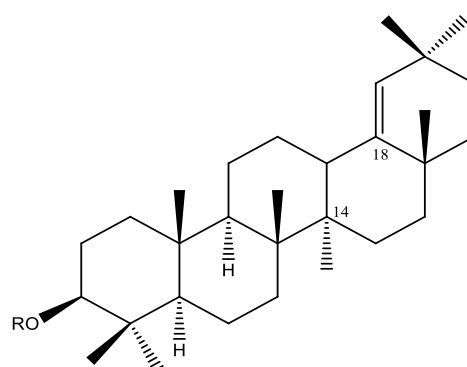
Figura 20: Estrutura química dos compostos detectados por CG-EM na fração de menor polaridade de folhas de *M. zapota*.



- 6 – β -amirina – $\text{R} = \text{R}_1 = \text{H}$; $\text{R}_2 = \text{CH}_3$
 7 – α -amirina – $\text{R} = \text{R}_2 = \text{H}$; $\text{R}_1 = \text{CH}_3$
 9 – Acetato de β -amirina – $\text{R} = \text{COCH}_3$; $\text{R}_1 = \text{H}$; $\text{R}_2 = \text{CH}_3$
 10 – Acetato de α -amirina – $\text{R} = \text{COCH}_3$; $\text{R}_1 = \text{CH}_3$; $\text{R}_2 = \text{H}$



11 – Acetato de lupeol



- 5 – Germanicol – $\text{R} = \text{H}$
 8 – Acetato de germanicol – $\text{R} = \text{COCH}_3$

Os acetatos de α e β -amirina correspondem aos compostos 9 e 10, respectivamente (Anexos 24 e 25) com picos em m/z 218, 203 e 189 característicos das amirinas (OYO-ITA et al., 2010) e fragmentos correspondentes à perda da porção acetil. O composto 11 foi identificado como acetato de lupeol com a presença dos picos m/z 453, 408, 365, 218, 189, 43 (Anexo 26) corroborando os dados

obtidos para o mesmo composto isolado em espécies do gênero *Dorstenia* (VILEGAS et al., 1997).

A presença das amirinas, seus acetatos e do acetato de lupeol foi anteriormente reportada em frutos e folhas *M. zapota* (FAYEK et al., 2012; MISRA; NIGAM; MITRA, 1970) e em outras espécies da família Sapotaceae (DE OLIVEIRA et al., 2014; FERNANDES et al., 2013; MISRA; NIGAM; MITRA, 1974; SILVA, 2007). O germanicol (**5**) e seu acetato (**8**) foram identificados em folhas de *Pouteria gardinerii* (Sapotaceae) (SILVA, 2007), no entanto, este é o primeiro registro na literatura da presença dos compostos **5** e **8** em folhas de *M. zapota*.

4. Testes de atividade anti-helmíntica *in vitro* frente ao *S. venezuelensis*

Grande parte dos estudos do gênero *Strongyloides* documentados na literatura envolvem testes com larvas (ISMAIL et al., 2016; MARUYAMA et al., 2006; SAQER et al., 2007), ovos (GONÇALVES et al., 2010), técnicas de imunodiagnóstico (DE CARVALHO et al., 2015; GONÇALVES et al., 2012, 2016) e ainda dados de distribuição e prevalência (BEKNAZAROVA; WHILEY; ROSS, 2016; BISOFFI et al., 2013; FORRER et al., 2016).

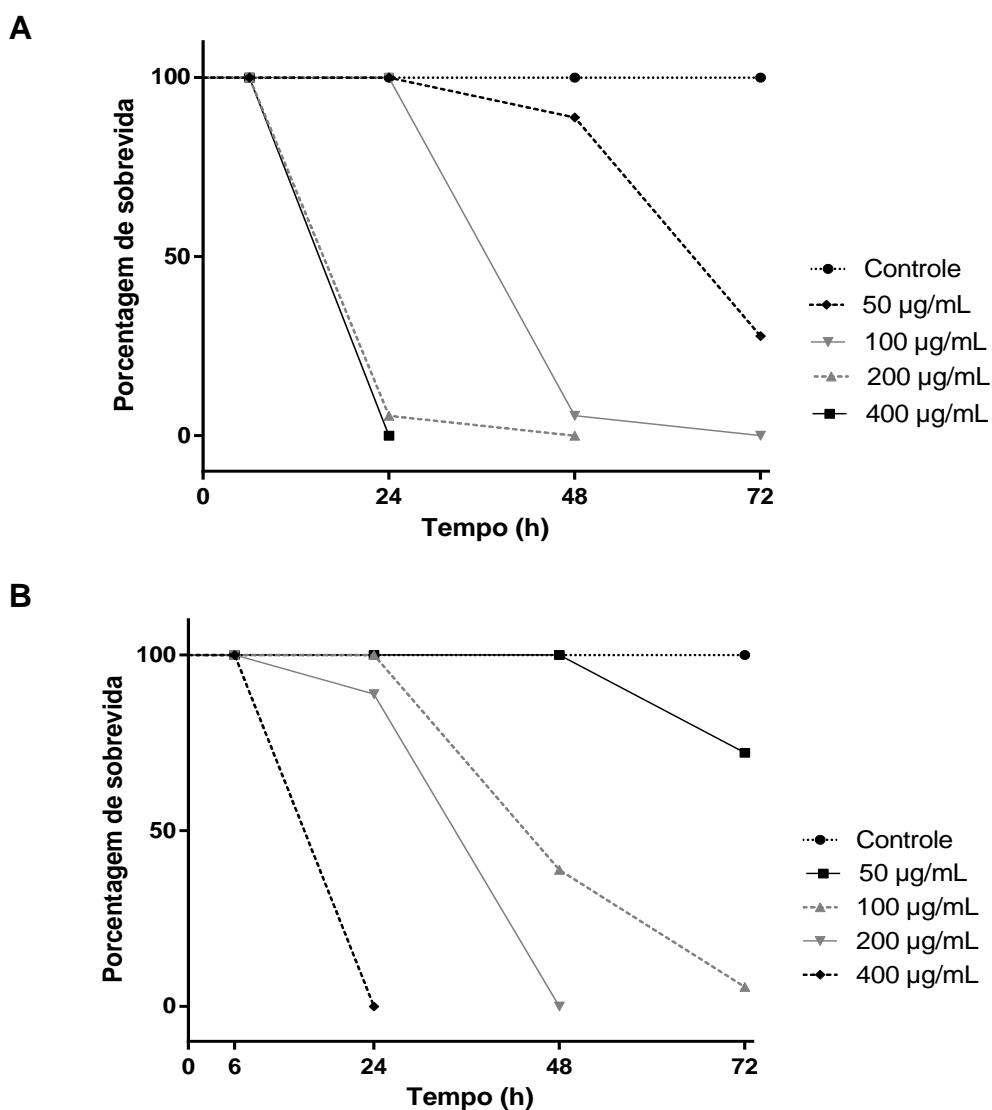
Em nosso estudo, o efeito anti-helmíntico de folhas de *M. zapota* foi avaliado a partir da observação da taxa de sobrevivência (%) de fêmeas parasitas (L4) de *S. venezuelensis* expostas ao extrato, frações (FMaP, F₂, F₃) e compostos isolados da planta. A integridade cuticular dos parasitas também foi observada no final do tempo de incubação. Para um melhor entendimento da estrongiloidíase humana e animal os modelos experimentais em roedores infectados com *S. venezuelensis* tem contribuído de maneira bastante satisfatória, por possuírem semelhanças no desenvolvimento da patogenia (GONÇALVES et al., 2016).

As amostras foram incorporadas em PVP (1:4 m/m) a fim de melhorar suas características de solubilidade (SANTOS, 2013). Todas as amostras testadas foram letais aos parasitas na concentração de 400 µg/mL, em 24 horas de incubação (Figuras 21, 22 e 23), com exceção da amostra F₃ que apresentou 33.3% de sobrevivência no mesmo tempo de exposição (Figura 22D).

Não houve sobrevivência nas concentrações de 200 e 100 µg/mL expostas ao EEMz em 72 horas de estudo (Figura 21A). A FMaPMz foi letal na concentração de 200 µg/mL em 48 horas, no entanto houve sobrevivência nas concentrações de 100 e 50 µg/mL (5,5% e 72%, respectivamente) no final do tempo de incubação (Figura 21B).

A F₂ foi letal em todas as concentrações testadas em 72 horas de exposição (Figura 22C).

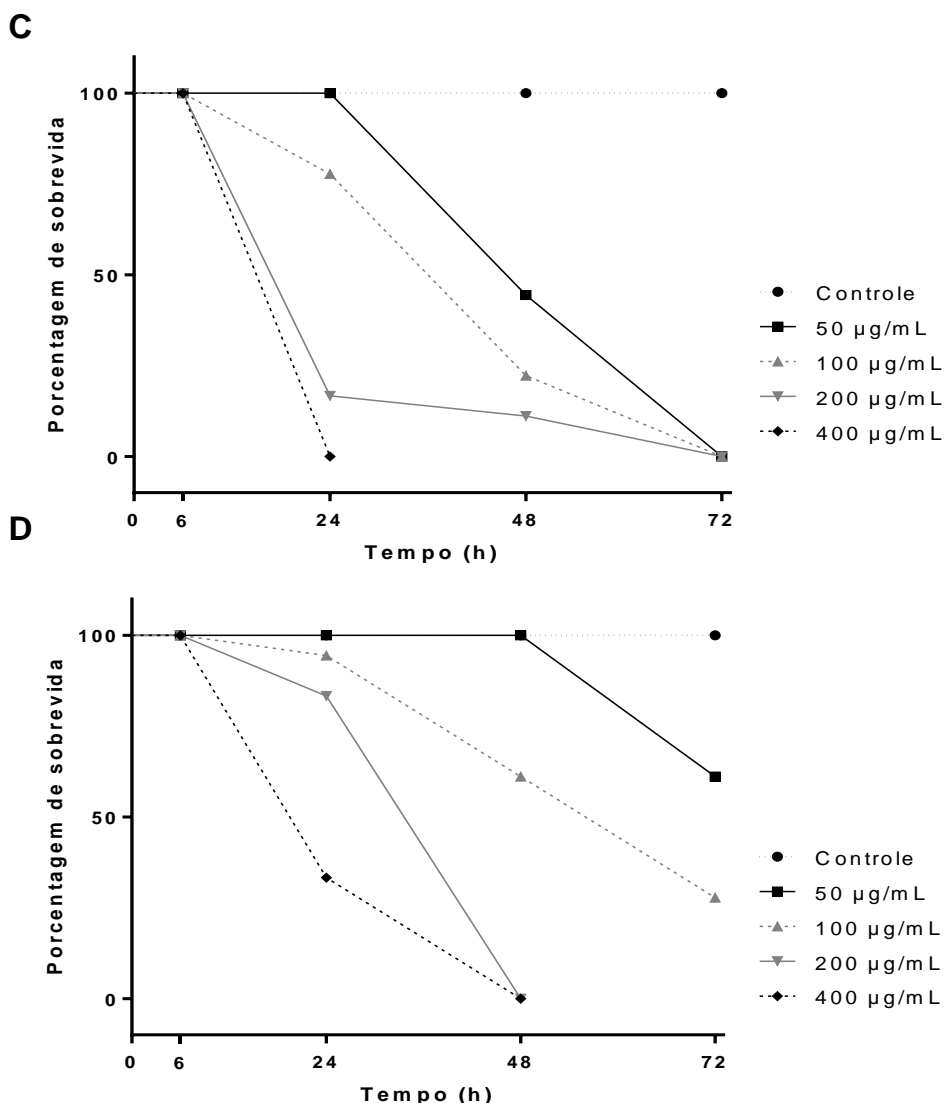
Figura 21: Atividade anti-helmíntica do extrato e fração inicial de folhas *M. zapota* frente ao *S. venezuelensis* em função do tempo de incubação.



A: Porcentagem de sobrevivência dos parasitas expostos ao EEMz **B:** Porcentagem de sobrevivência dos parasitas expostos à FMaPMz.

O EHxActMz e a FMePMz também foram testados, mas não reduziram a sobrevivência dos parasitas expostos em nenhuma das concentrações avaliadas. A F₃ foi letal em 48 horas nas duas concentrações mais altas utilizadas no estudo (Figura 22D).

Figura 22 Atividade anti-helmíntica das frações de folhas de *M. zapota* frente ao *S. venezuelensis* em função do tempo de incubação.

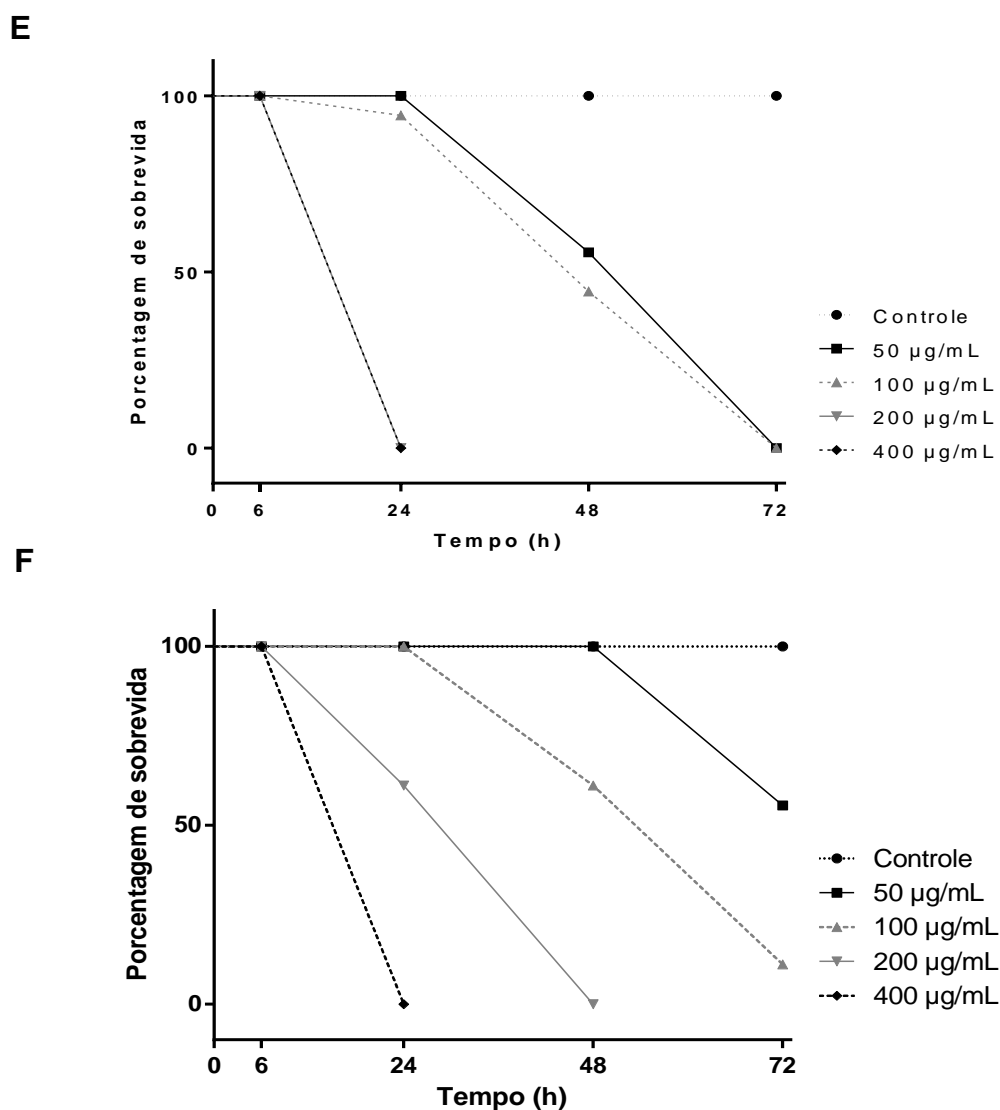


C: Porcentagem de sobrevivência dos parasitas expostos à F_2 ; **D:** Porcentagem de sobrevivência dos parasitas expostos à F_3 .

Os parasitas expostos ao AC na concentração de 200 µg/mL morreram nas primeiras 24 horas do estudo e, ao final das 72 horas não houve sobrevivência nas demais concentrações testadas (Figura 23E). Ao final do tempo de incubação os vermes expostos ao composto **3** não sobreviveram nas concentrações de 400 e 200 µg/mL, no entanto nas concentrações de 100 e 50 µg/mL houve sobrevivência dos vermes (11,1 e 61,1% respectivamente) (Figura 23F). A partir da análise estatística das curvas de sobrevivência (Teste de Mantel-cox) tem-se que elas foram

estatisticamente diferentes entre si e em relação à curva do controle em um p valor $< 0,0001$.

Figura 23: Atividade anti-helmíntica dos compostos isolados de folhas de *M. zapota* frente ao *S. venezuelensis* em função do tempo de incubação.

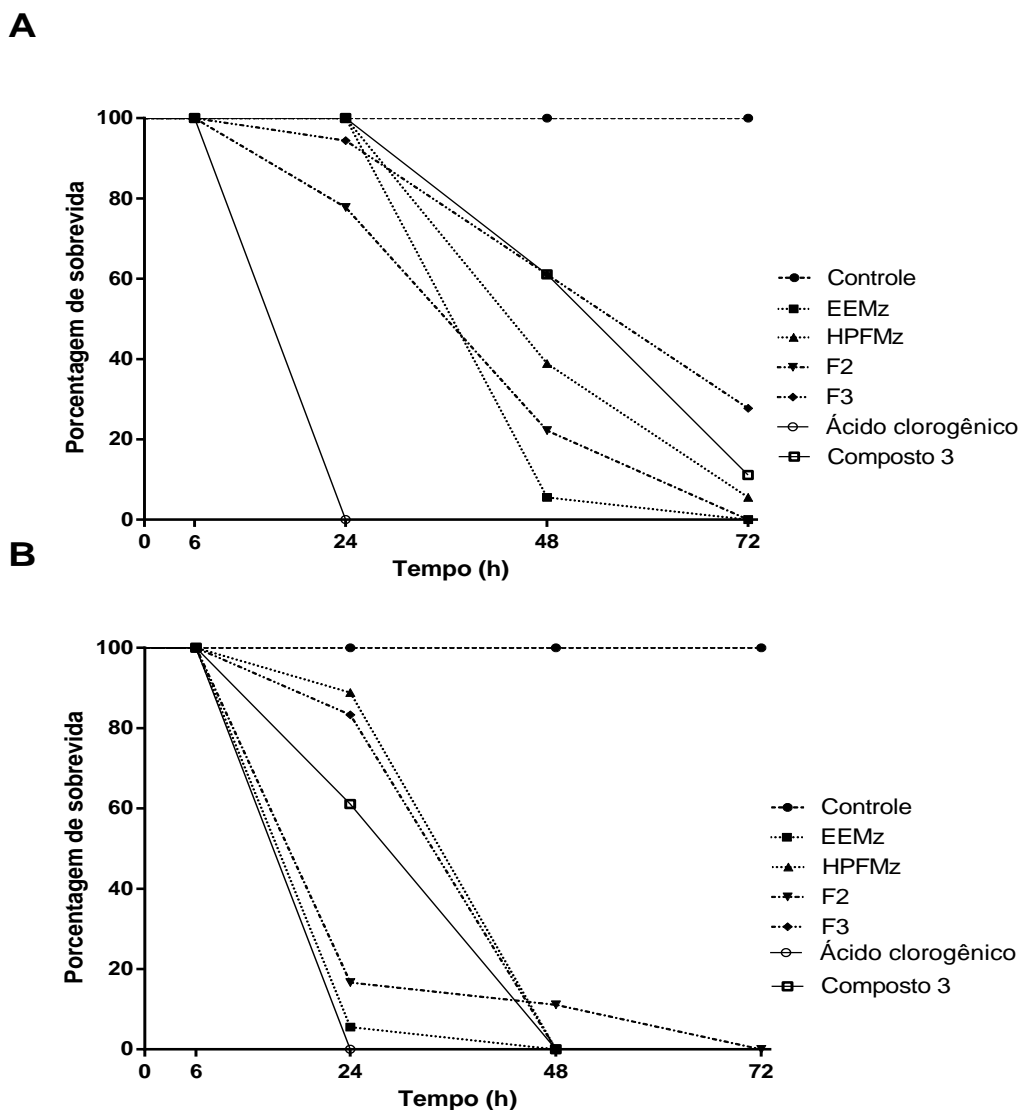


E: Porcentagem de sobrevivência dos parasitas expostos ao ácido clorogênico (AC); **F:** Porcentagem de sobrevivência dos parasitas expostos ao composto **3** (miricitrina).

Comparando a ação de todas as amostras na concentração de 100 µg/mL, o AC foi letal nas primeiras 24 horas de observação e somente EEMz e F₂ apresentaram mortalidade total ao final do tempo de incubação (Figura 24A). Em 200 µg/mL e 24 horas, observou-se que o AC foi letal, em 48 horas apenas F₂

apresentou sobrevida (11,1%) e ao final do tempo de incubação não houve sobrevida em nenhuma das amostras testadas (Figura 24B).

Figura 24: Comparação da atividade anti-helmíntica do extrato, frações e compostos isolados de folhas de *M. zapota* nas concentrações intermediárias do estudo em função do tempo de incubação.



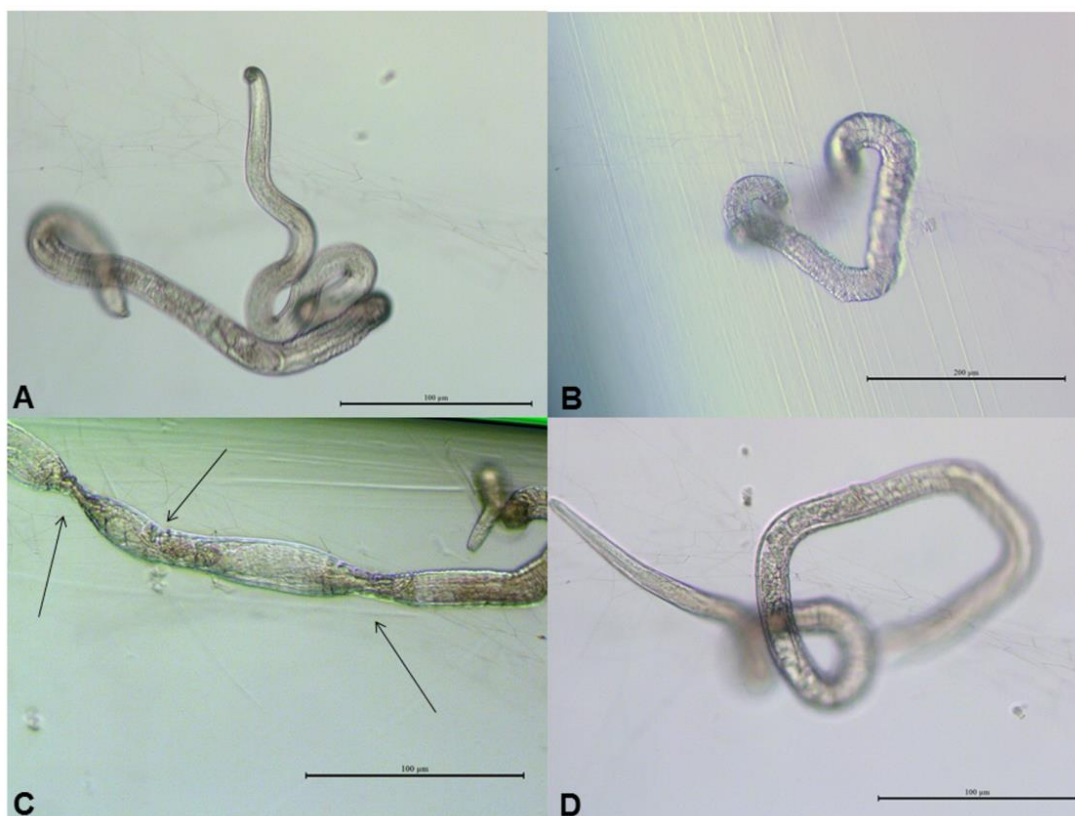
A: concentração de 100 µg/mL; **B:** concentração de 200 µg/mL.

Os parasitas expostos à ivermectina (nas mesmas concentrações do estudo) apresentaram redução da motilidade, no entanto sobreviveram durante as 72 horas de observação. Um comportamento semelhante dos parasitas frente à ivermectina foi observado no estudo *in vitro* realizado por Boonmars e colaboradores

(2005) no qual, larvas infectantes (L3) de *S. stercoralis*, expostas à ivermectina (250 µg/mL) apresentaram redução na motilidade, no entanto, sobreviveram durante os 6 dias de exposição.

A Figura 25 apresenta as imagens dos parasitas após 72 horas de incubação. Os vermes expostos à miricitrina (Figura 25B) apresentaram distorções e enrugamento cuticular. Aqueles tratados com a F₂ (Figura 25C) apresentaram distorções, depressões e alterações na integridade cuticular, sugerindo a possibilidade de danos citotóxicos diretos na morfologia dos vermes. Já os parasitas expostos à ivermectina (Figura 25D) sofreram redução da motilidade, no entanto mantiveram a integridade da superfície cuticular semelhante à do controle (Figura 25A).

Figura 25: Fêmeas partenogenéticas de *S. venezuelensis* a 400 µg/mL e 72 horas de incubação.



A: Parasita do grupo controle com cutícula preservada. **B:** Parasita exposta à miricitrina com enrugamento cuticular. **C:** Parasita exposto à F₂ com alterações cuticulares (setas). **D:** Parasita tratado com ivermectina, com integridade cuticular preservada.

A presença de distorções, fissuras longitudinais e transversais em fêmeas de vida livre de *Strongyloides* ssp. expostas ao extrato metanólico de *Lawsonia inermis* foi reportada anteriormente por Ismail e colaboradores (2016). Segundo Sarojini et al. (2012) essas alterações são resultado da potente ação anti-helmíntica do extrato de *L. inermis* devido à presença de glicosídeos, terpenoides e flavonoides em sua composição.

Estudos que empregam espécies vegetais na busca de novos tratamentos de parasitoses veterinárias e humanas estão descritos na literatura. A ação dos extratos aquoso e etanólico de *Spondias mombi* frente aos nematoides gastrintestinais ovinos e a ação de extratos de *Piper tuberculatum*, *Lippia sidoides* e *Mentha piperita*, frente ao *Haemonchus contortus* em testes *in vitro* foram comprovadas em trabalhos realizados por Ademola, Fagbemi e Idowu (2005) e Carvalho e colaboradores (2012), respectivamente.

Foi demonstrada a ação esquistossomicida *in vitro* do extrato diclorometano e de uma mistura de dois isoflavonoides isolados de sementes de *Millettia thonningii* sobre cercárias e formas adultas (LYDDIARD; WHITFIELD; BARTLETT, 2002). Ayers e colaboradores (2008) isolaram flavonas de *Struthiola argentea* que apresentaram ação antiparasitária comprovada contra larvas de *H. contortus*.

O ácido clorogênico é um polifenol de ampla distribuição em folhas e frutos de plantas dicotiledôneas (XU; HU; LIU, 2012). Sua atividade antioxidante é amplamente reconhecida e outras atividades biológicas tais como ação antimutagênica, anticarcinogênica e aumento da defesa celular também foram reportadas (SATO et al., 2011).

Ndhala et al. (2015) descreveram a composição química e atividade anti-helmíntica de extratos de *Achyranthes aspera* coletadas em duas áreas geográficas distintas da África (Ukulinga e Ciaat) frente ao nematoide de vida livre *Caenorhabditis elegans*. O extrato obtido com os espécimes coletados em Ciaat exibiu melhor atividade anti-helmíntica quando comparada à ação daquele obtido com espécimes coletados em Ukulinga (concentração letal mínima de 1,17 e 0,59 mg/mL, respectivamente). Análises UHPLC-MS/MS revelaram a presença de rutina, ácido clorogênico e genisteína nos espécimes coletados em Ciaat e a ausência desses compostos no extrato com espécimes de Ukulinga. Assim, esses autores sugerem que a melhor atividade anti-helmíntica do extrato de *A. aspera* coletada em

Ciaat pode estar associada à presença desses compostos fenólicos em sua composição.

Em um estudo comparativo realizado por Tasdemir et al. (2006) foi demonstrada a ação leishmanicida (*Leishmania donovani*) e tripanocida (*Trypanosoma brucei rhodesiense* e *Trypanosoma cruzi*) de vários flavonoides, dentre eles a miricetina e seus derivados di e trimetil éteres. Considerando a ação leishmanicida, os compostos apresentaram IC₅₀ de 1,3, >30 e >30 µg/mL respectivamente. Para a atividade contra *T. brucei rhodesiense* os IC₅₀ foram de 15,9 e 6,1 e 6,0 µg/mL. A potencial ação leishmanicida da miricetina foi relacionada à presença do grupo pirrogalol (hidroxilas em C-3', C-4' e C-5'). Os derivados metoxilados apresentaram atividade tripanocida semelhante entre si e superior à miricetina. Esta ação foi atribuída à presença de metoxilas no anel B desses compostos.

A comparação entre flavonoides análogos tem revelado uma íntima relação entre suas estruturas e a atividade antiparasitária. A presença de substituintes (hidroxil, metil, metoxi e glicosídeos) tem papel fundamental na magnitude da ação desses compostos. Assim, considerando-se a presença de hidroxilas, o número e o padrão de hidroxilação no anel B afetam drasticamente a atividade antiparasitária dos flavonoides (KERBOEUF; RIOU; GUEGNARD, 2008). Porém, a relação entre outras modificações estruturais e atividade ainda não está bem estabelecida.

Os mecanismos de ação dos flavonoides em helmintos ainda não estão totalmente elucidados. Dentre eles têm sido propostos: (1) o aumento do aporte de óxido nítrico que age como neurotransmissor em junções neuromusculares e causa mioinibição; (2) a inibição não-específica de esterases e colinesterases que leva à desorganização neuromuscular dos parasitas; (3) o aumento do efluxo de cálcio que causa a despolimerização da rede microtrabecular e a consequente desorganização e desagregação dos miofilamentos e (4) a diminuição dos níveis de aminoácidos livres e aumento dos níveis de ácido glutâmico, glutamina citrulina e ácido gama aminobutírico (GABA) que implicam na liberação de ácido nítrico que por sua vez resulta em alterações neurológicas (KERBOEUF; RIOU; GUEGNARD, 2008).

Nosso estudo é o primeiro registro da ação direta de extratos, frações e compostos isolados de *M. zapota* sobre fêmeas adultas parasitárias de *S. venezuelensis* e demonstra a ação anti-helmíntica potencial dessa espécie com

destaque para o extrato etanólico, F₂, miricetina e ácido clorogênico. A identificação química mostra que, tanto o extrato etanólico quanto as frações apresentaram flavonoides glicosídicos, ácidos fenólicos e seus derivados em sua composição, o que sugere que a ação anti-helmíntica efetiva contra o nematoide pode estar associada à presença desses compostos nas folhas de *M. zapota*.

5. Efeito de extratos, frações e isolados de *M. zapota* sobre queratinócitos humanos (HaCaT).

Os valores de TGI (Total Growth Inhibition) foram calculados para as amostras testadas. Fouche et al. (2008 apud DELLA TORRE, 2013) descreveu critérios para classificação de amostras com atividade antiproliferativa de acordo com os valores de TGI. Com base no TGI, a atividade antiproliferativa em linhagens tumorais pode ser dividida em 4 categorias: (1) inativo (TGI > 50 µg/mL); (2) atividade fraca (15 µg/mL < TGI < 50 µg/mL), (3) atividade moderada (6,25 µg/mL < TGI < 15 µg/mL) e (4) atividade potente (TGI < 6,25 µg/mL).

Os valores de TGI para EEMz, FMaPMz, F₂, F₃, AC e miricitrina foram: 94,92, 197,97, 238,02, superior a 250, 242,99 e 150.33 µg/mL, respectivamente. A partir dos critérios adotados podemos inferir que as amostras testadas não apresentaram atividade antiproliferativa sobre queratinócitos humanos (TGI > 50 µg/mL).

6. Atividade antimicrobiana *in vitro*

As concentrações inibitórias mínimas (MICs) do EEMz, das frações FMaPMz e FMePMz e dos flavonoides **2**, **3** e **4** estão apresentadas na Tabela 5. Critérios para a avaliação antimicrobiana de produtos naturais a partir dos valores de MIC ainda não estão bem estabelecidos na literatura (CONSTANZO et al., 2013; HOLETZ et al., 2002).

Holetz e colaboradores (2002) selecionaram extratos hidroalcoólicos de plantas brasileiras utilizando a técnica de microdiluição e definiram a potencialidade das amostras sendo: MIC < 0,1 mg/mL potente atividade antimicrobiana; MIC de 0,1 a 0,5 mg/mL atividade moderada e MIC de 0,5 a 1 mg/mL como atividade antimicrobiana fraca. Os extratos que apresentam MIC superior a 1 mg/mL são considerados ineficazes.

Assim, os resultados obtidos neste trabalho demonstram que EEMz, FMePMz e FMPaMz apresentaram atividade potente contra *C. albicans* (16 µg/mL), enquanto EEMz apresentou atividade moderada frente a *S. aureus* (128 µg/mL) e ao *T. rubrum* (256 µg/mL). Já FMaPMz apresentou atividade potente contra *S. aureus* (32 µg/mL) e moderada para *T. rubrum* (128 µg/mL). A FMePMz apresentou atividade moderada frente à bactéria (128 µg/mL) e atividade fraca frente ao dermatófito (> 512 µg/mL).

Tabela 5: Concentração Inibitória Mínima (MIC) de extratos, frações iniciais e flavonoides isolados das folhas de *M. zapota*.

Cepa	MIC (µg/mL)						
	EEMz	FMaPMz	FMePMz	2	3	4	Ctrl pos [*]
<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	16	16	16	>128	>128	>128	8 ^a
<i>T. rubrum</i> (SNB-TR1)	256	128	>512	16	64	128	3,125·10 ^{-3 a} 2 ^b
<i>S. aureus</i> (ATCC29213)	128	32	128	8	32	32	2 ^c

*Controle positivo: ^a fluconazol; ^bitraconazol; ^coxacilina.

EEMz: extrato etanólico, **FMaPMz** fração de maior polaridade; **FMePMz** fração de menor polaridade; **(2)** miricetina-2-glicosídeo, **(3)**: miricitrina e **(4)**: mearnsitrina.

A literatura demonstra que a presença de terpenoides e flavonoides glicosídicos em extratos brutos têm importante papel no desempenho da sua atividade antimicrobiana. (COWAN, 1999). A presença de tais compostos no extrato e na fração de maior polaridade das folhas de *M. zapota* foi comprovada em nossos estudos químicos, o que pode atribuir em parte a ação antimicrobiana expressiva frente aos patógenos testados.

As propriedades antimicrobianas de extratos de *M. zapota* frente ao *S. aureus* foram observadas em estudos anteriores (ABU OSMAN et al., 2011; KANERIA et al., 2009; NAIR; CHANDA, 2008). Em relação aos resultados obtidos para *C. albicans* nossos resultado difere do estudo prévio realizado por Abu Osman et al. (2011) que observaram que o extrato de folhas coletadas em Bangladesh e

obtido em acetato de etila. não foi ativo frente à *C. albicans*. Contudo, nossos resultados confirmam o estudo de Kaneria e Chanda (2012) que utilizaram o extrato aquoso de folhas de *M. zapota*, coletadas na Índia, e comprovaram sua efetiva ação antifúngica. Estudos anteriores também demonstraram a potencial ação do extrato das sementes de *M. zapota* frente a várias espécies de *Candida* (OTARI et al., 2014).

É reportado na literatura que a mistura isomérica de α e β -amirina possui atividade antimicrobiana (FERNANDES et al., 2013). Nossos estudos químicos confirmaram a presença desses compostos e seus ésteres na fração de menor polaridade (FMePMz), o que poderia explicar a ação pronunciada dessa fração frente à *C. albicans* e moderada para *S. aureus*.

Flavonoides com ação antibacteriana têm sido isolados com sucesso em estudos anteriores. Ríos e Recio (2005) estabeleceram os valores para determinar a magnitude dessa atividade considerando que extratos contendo esses compostos com MICs inferiores a 100 $\mu\text{g/mL}$ e flavonoides isolados com MICs menores que 10 $\mu\text{g/mL}$ seriam considerados de muito interesse, por sua alta potência.

Considerando esse critério o EEMz e a FMaPMz, que contém flavonoides, apresentaram potente atividade frente à *C. albicans* (16 $\mu\text{g/mL}$), o extrato teve ação moderada frente à bactéria. Para os isolados tem-se que, o composto miricetina-3-glicosídeo (**2**) apresentou potente atividade frente ao *S. aureus* (8 $\mu\text{g/mL}$) e atividade moderada contra *T. rubrum* (16 $\mu\text{g/mL}$), já a miricitrina (**3**) teve ação de moderada à fraca contra a bactéria gram-positiva e o dermatófito (MICs de 32 e 64 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) e a mearnsitrina (**4**) apresentou atividade fraca contra *S. aureus* (32 $\mu\text{g/mL}$) e foi inativa frente aos demais microrganismos testados.

Flavonoides tais como quecertina, miricetina e kaempferol atraem grande interesse devido às suas diversas atividades biológicas. A presença de uma ou mais unidades de açúcar em diferentes posições da aglicona pode aumentar a solubilidade e intensificar as propriedades medicinais inerentes a esses compostos (REN et al., 2012).

Observando as mudanças estruturais nos flavonoides isolados em nosso estudo tem-se que a substituição da glicose no composto **2** por uma ramnose na miricitrina (**3**) promoveu a redução da atividade frente ao *S. aureus* e ao *T. rubrum*. Já a substituição do radical hidroxilado no C-4' da miricitrina (**3**) por uma metoxila

(OCH₃) na mearnsitrina (**4**) influenciou negativamente a atividade frente à bactéria e ao dermatófito.

De acordo com Cushnie e Lamb (2005) os mecanismos de ação antimicrobiana dos flavonoides seriam: (1) inibição da síntese de ácidos nucleicos, (2) inibição das funções da membrana citoplasmática e a inibição do metabolismo energético. Os mesmos autores comentam que o estudo realizado por Mori e colaboradores (1987 apud CUSHNIE; LAMB, 2005) utilizando percussores radioativos demonstrou a forte inibição da síntese de RNA em *S. aureus* causada pelos flavonoides robinetina, miricetina e (–)-epigallocatequina.

Todas amostras testadas apresentaram ação antimicrobiana, em diferentes magnitudes contra os três patógenos testados: com destaque para extrato e frações iniciais frente à *C. albicans*, FMaPMz e miricetina-3-glicosídeo (**2**) frente ao *S. aureus* e *T. rubrum*. Esse fato demonstra o alto potencial antimicrobiano das folhas de *M. zapota* no combate a três importantes microrganismos patogênicos humanos.

7. Conclusão

A avaliação da composição química do EEMz resultou na identificação de ácido clorogênico (**1**), isolamento e determinação estrutural dos flavonoides miricetina- 3- glicosídeo (**2**), miricitrina (**3**) e mearnsitrina (**4**), presentes na FMaPMz. O composto germanicol (**5**) e o seu acetato (**8**) foram identificações na FMePMz além da β e α -amirinas (**6** e **7**), seus acetatos (**9** e **10**) e o acetato de lupeol (**11**).

As atividades anti-helmíntica, antibacteriana, antifúngica do extrato, frações e compostos isolados também foram avaliadas. O ácido clorogênico e a miricitrina (**3**) presentes na FMaPMz mostrou ação potencial frente ao *S. venezuelensis*. O EEMz, e frações enriquecidas com compostos fenólicos também foram ativos contra esse parasita. A fração contendo triterpenos pentacíclicos (FMePMz) e os flavonoides **2**, **3** e **4**. apresentaram ação antimicrobiana promissora. Este é o primeiro relato sobre a identificação dos compostos **1**, **2**, **4**, **5** e **8**, em folhas de sapoti.

Este estudo forneceu bases científicas consistentes sobre a possibilidade do uso de plantas e compostos de origem natural no combate à strongiloidíase e infecções microbianas. O desenvolvimento de novos agentes terapêuticos a partir desses compostos requer estudos mais aprofundados, no entanto representa uma

alternativa promissora no tratamento dessas enfermidades de grande abrangência e difícil controle.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO REFERENTES À ESPÉCIE *Mimusops commersonii* (G. Don) Engl..

Neste capítulo apresentamos os resultados dos estudos bioquímicos das folhas de *M. commersonii* que envolveu a obtenção de extratos, fracionamento, purificação e elucidação estrutural dos compostos isolados além daqueles obtidos nos testes *in vitro* de atividade anti-helmíntica frente ao *S. venezuelensis*, atividades antibacteriana e antifúngica.

1. Obtenção de extratos e frações

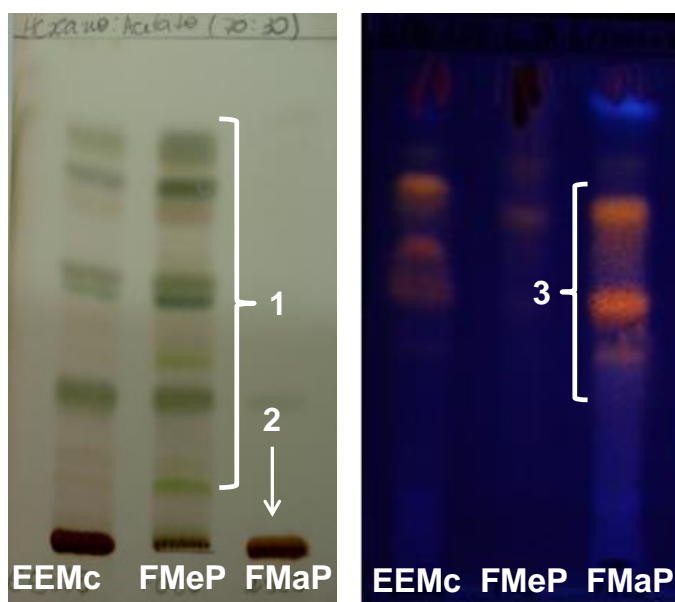
O EEMc foi obtido por turbolização e apresentou 8,85% de rendimento e seu fracionamento pelo mesmo método utilizando acetato de etila forneceu, após secagem, as frações FMePMc e FMaPMc com rendimentos de 40,33 e 54,00%, respectivamente (Tabela 6). A FMaPMc foi purificada por 2 métodos: (1) filtração em poliamida seguida de SPE e HPLC preparativa (500 mg da amostra) e (2) Cromatografia Flash seguida de separação em coluna preparativa, para 2g da fração. No primeiro método foram obtidos os compostos **1'** (0,3 mg), **2'** (15,5 mg,) e **4'** (36,7 mg) O segundo método possibilitou o isolamento dos compostos **3'**(9,5 mg) e **5'**(4,9 mg) além de **2'** (51,3 mg) e **4'** (154,1 mg) isolados anteriormente. Os fluxogramas correspondentes à extração, fracionamento e purificação podem ser observados nas Figuras 6, 7 e 8 no Capítulo 2.

Tabela 6: Características dos extratos e frações obtidos no processo de fracionamento e purificação das folhas de *M. commersonii*.

Amostra	Material precursor/ massa		Massa final	Rendimento (%)
		(g)	(g)	
EEMc	Folhas	900	79,65	8,85
EHxAcMc _{soxhlet}	Folhas	100	8,46	8,46
EEMc _{soxhlet}	Folhas	100	7,46	7,46
FMePMc	EEMc	30	12,1	40,33
FMaPMc	EEMc	30	16,2	54,00
FMeOHMc	FMaPMc	0,5	0,49	99,4
F IV _{SPE}	FMeOHMc	0,497	0,11	22,30
F ₃ flash	FMaPMc	2,0	0,28	14,00

A avaliação dos compostos presentes nos extratos e frações de *M. commersonii* foi feita por análises de CCD (Figura 26).

Figura 26: Cromatogramas referentes ao fracionamento do extrato etanólico de *M. commersonii*.



Placa A: Fase móvel: hexano: acetato de etila (70:30), revelador: solução de anisaldeído (1): bandas correspondentes aos compostos de média e baixa polaridade (2): Compostos de FMaP retidos no ponto de aplicação; **Placa B:** fase móvel: acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100:11:11:26) Revelador: NP e macrogol e sob luz UV- 366nm (3): bandas correspondentes aos compostos de maior polaridade.

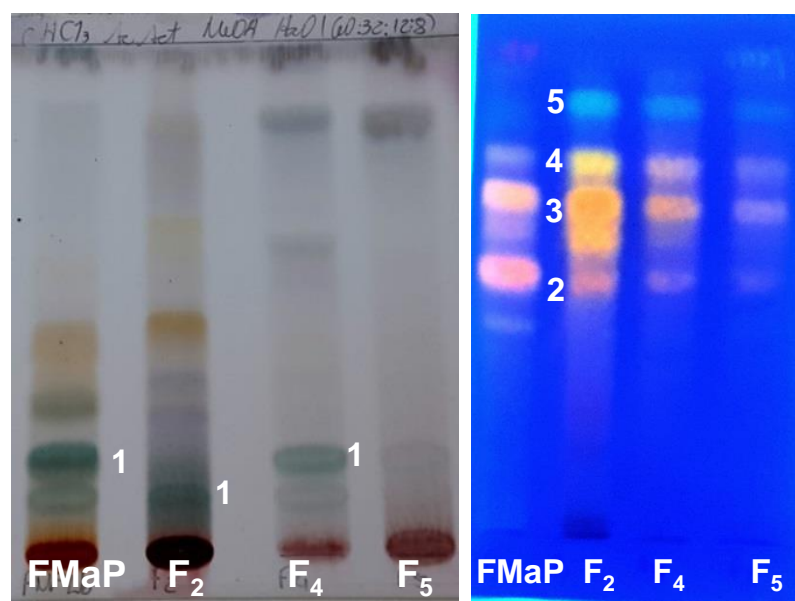
A cromatoplaça A foi obtida a partir da eluição das amostras com hexano: acetato (70:30) e revelação com anisaldeído. A FMeP apresentou grande quantidade de compostos de média e baixa polaridade presentes no EEMc enquanto que a FMaP apresentou compostos retidos no ponto de aplicação da amostra (Figura 26A).

Na placa B, foi feita uma busca por compostos fenólicos com a utilização de uma fase móvel de caráter polar comumente utilizada para este fim. O EE e a FMaP mostraram bandas com fluorescências laranja indicativa da presença dos compostos supracitados enquanto a FMeP não apresentou fluorescência (Figura 26B). A análise por CCD demonstrou a eficiência do método inicial de fracionamento

do extrato etanólico por turbolização com acetato de etila comprovada pela separação efetiva entre compostos de diferentes polaridades.

A análise por CCD da FMaPMc e suas subfrações (F₂, F₄ e F₅) obtidas por separação em coluna Flash foi feita com o objetivo de avaliar a presença de saponinas (placa A) e compostos fenólicos (placa B) (Figura 27).

Figura 27: Cromatogramas referentes às frações obtidas por cromatografia Flash (F₂, F₄ e F₅) das folhas de *M. commersonii* (FMaP).



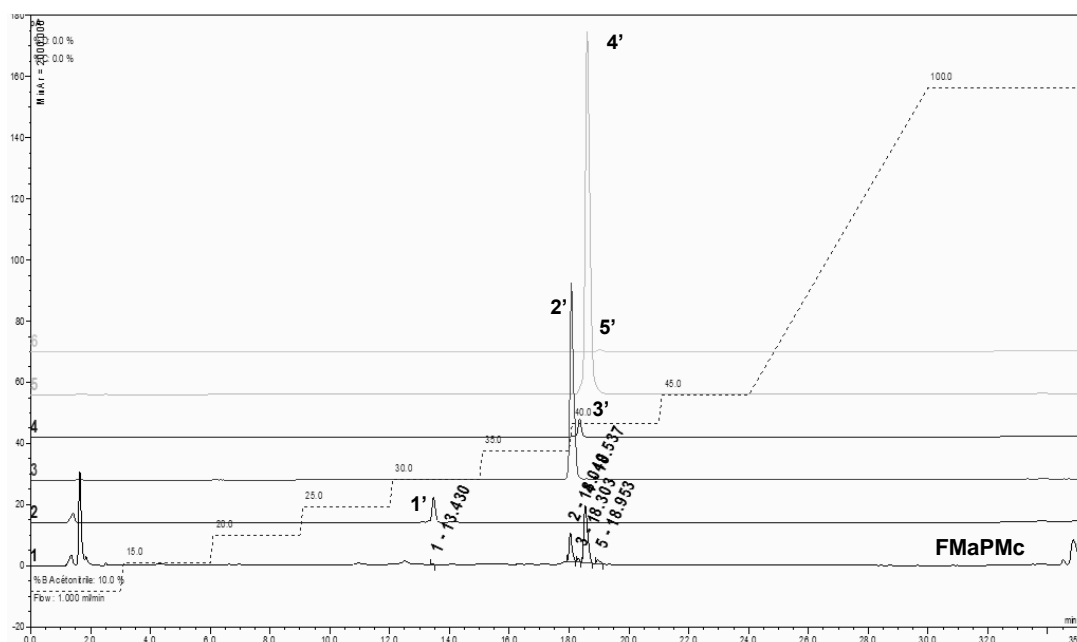
Placa **A**: Fase móvel: clorofórmio: ácido acético: metanol: água (60:32:12:8) revelador: solução de anisaldeído (1): bandas indicativas da presença de saponinas; Placa **B**: Fase móvel: acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100:11:11:26) Revelador: NP e macrogol e sob luz UV- 366nm (2) (3) e (4) bandas indicativas da presença de flavonoides; (5) bandas correspondentes a ácidos fenólicos

A placa A mostra a presença de saponinas nas frações F₂ e F₄ pela visualização das bandas cinza-esverdeadas (WAGNER; BLADT, 1996). A placa B apresentou bandas com fluorescência alaranjada (1, 2 e 3) nas frações F₂ e F₄ evidenciando a presença de compostos fenólicos, em adição essa placa também apresentou bandas com fluorescência azuladas com RF superior a 0,5 com maior intensidade nas frações F₂ e F₄ (1) característica de ácidos fenólicos. (WAGNER; BLADT, 1996).

2. Análise e elucidação estrutural dos compostos isolados da fração de maior polaridade (FMaPMc)

A Figura 28 apresenta os perfis analíticos dos compostos **1'** (0,3 mg), **2'** (67 mg), **3'** (9,5 mg), **4'** (190,0 mg) e **5'** (4,9 mg) com seus tempos de retenção correspondentes de 13,43, 18,04, 18,30, 18,53 e 18.,95 min, respectivamente.

Figura 28: Perfis analíticos por HPLC dos compostos isolados (**1'**, **2'**, **3'**, **4'** e **5'**) da fração de maior polaridade da *M. commersonii* comparados à fração original FMaPMc.



Fase móvel: CH₃CN: H₂O; Coluna C18 analítica 150x 4.6 mm, 5 micron – Phenomenex® com fluxo de 1mL·min⁻¹; Detector CAD.

A fração de maior polaridade de *M. commersonii* apresentou compostos descritos em estudos anteriores (**1'** - **5'**) (ESKANDER et al., 2005; MATSUNAMI et al., 2009), no entanto a descrição dos mesmos para essa espécie é inédita. As atribuições estruturais foram feitas por análise de rotação óptica e dados espectrais de HRESITOFMS e RMN 1D (¹H, ¹³C) e 2D incluindo as correlações de COSY, HSQC e HMBC (Anexos de 27 a 48). A caracterização foi realizada pela comparação dos dados obtidos com aqueles relatados na literatura para os compostos isolados em outras espécies.

O espectro de massas HRESITOFMS do composto **1'** apresentou picos de íon pseudomoleculares em $m/z = 371.2062$ $[M+H]^+_{\text{exp.}}$ ($m/z = 371.2070$ $[M+H]^+_{\text{calcd.}}$) com fórmula bruta $C_{19}H_{31}O_7$ e em $m/z = 415.1974$ $[M+FA-H]^-_{\text{exp.}}$ (com $m/z = 415.1968$ $[M+FA-H]^-_{\text{calcd.}}$) correspondendo à fórmula bruta $C_{20}H_{31}O_9$, tem-se como fórmula molecular $C_{19}H_{30}O_7$ com massa de 370.

A análise do espectro de RMN 1H do composto **1'** apresentou sinais com deslocamentos químicos em δ 5,87 ppm (1H, sl), 5,75 (1 H, dd, $J = 15,3$ e $9,2$ Hz) e 5,59 (1H, dd, $J = 15,3$ e $7,3$ Hz) característicos de hidrogênios oleofínicos. Segundo Ito et al., (1994) os prótons com deslocamento químico em 5,87 e 5,75 ppm possuem acoplamento vicinal (3J) que caracteriza a presença de uma dupla ligação *trans* dissubstituída. Já o sinal em δ 4,48 (1H, m) é característico de um hidrogênio oximetínico, que se acopla a três prótons da metila vicinal e a um dos prótons oleofínicos produzindo um multipeto.

Os deslocamentos químicos em δ 2,05 (1H, d, $J = 16,4$ Hz) e 2,48 (1H, d, $J = 17,0$ Hz) foram atribuídos a prótons metilênicos H-2 α e H-2 β . O sinal 1,98 ppm (3H, d, $J = 1,2$ Hz) indicou a presença de hidrogênios metílicos acoplados a longa distância com um hidrogênio metilênico na mesma posição espacial. Os prótons em δ 1,29 (3H, d, $J = 6,7$ Hz) foram atribuídos a hidrogênios metílicos que se acoplam ao H oximetínico, Os deslocamentos químicos em δ 1,03 (3H, s) e δ 0,99 (3H, s) também são referentes a prótons metílicos.

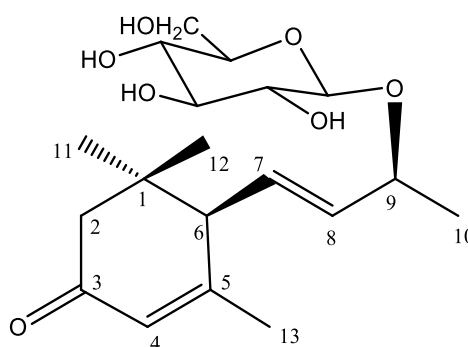
Os sinais em δ 4,31 (1H, d, $J = 7,5$ Hz), 3,63 (1H dd, $J = 11,6$ e $6,1$ Hz), 3,88 (1H, dd, $J = 11,6$ e $2,4$ Hz), 3,10 – 3,60 foram característicos da presença de uma unidade de açúcar ligada à estrutura principal do composto **1'**.

A partir da comparação dos dados de HRESITOFMS e RMN obtidos com aqueles descritos na literatura teve-se como possíveis moléculas dois isômeros, os compostos (6R, 9S) -3-oxo- α -ionol- β -D-glicopiranosídeo e (6R, 9R) -3-oxo- α -ionol- β -D- glicopiranosídeo.

Existem diferenças nos deslocamentos químicos dos prótons olefínicos H7 e H8 entre os dois glicosídeos. Segundo Pabst et al. (1992), quando se trata do composto (6R, 9R) H-7 assume valores em torno de δ 5,63 ($J = 15,5$ e $8,4$ Hz) e H-8 de 5,78 ($J = 15,3$ e $6,0$ Hz), quando se trata do composto (6R, 9S) tem-se o H-7 em 5,84 com constantes de 15,4 e $9,4$ Hz e H-8 em 5,67 ppm com constantes de 15,4; e $7,4$ Hz.

De acordo com nossos dados, um dos hidrogênios olefínicos apresentou deslocamento químico em 5,75 ppm com J de 15,3 e 9,2 Hz. Essa última constante é decorrente do acoplamento com H-6, este por sua vez apresentou-se como um dubleto bem definido em 2,69 ppm com J de 9,3 Hz, comprovando que o deslocamento em 5,75 ppm se tratava de H-7. Já o outro H olefínico apresentou um sinal em 5,58 ppm (dd) com $J = 15,3$ e 7,3 Hz, sendo atribuído ao H-8. A partir desses dados o composto **1'** foi identificado como o (6R, 9S) 3- oxo- α - ionol- β - D- glicopiranosídeo (Figura 29).

Figura 29: Estrutura do composto **1'** isolado de *M. commersonii*.



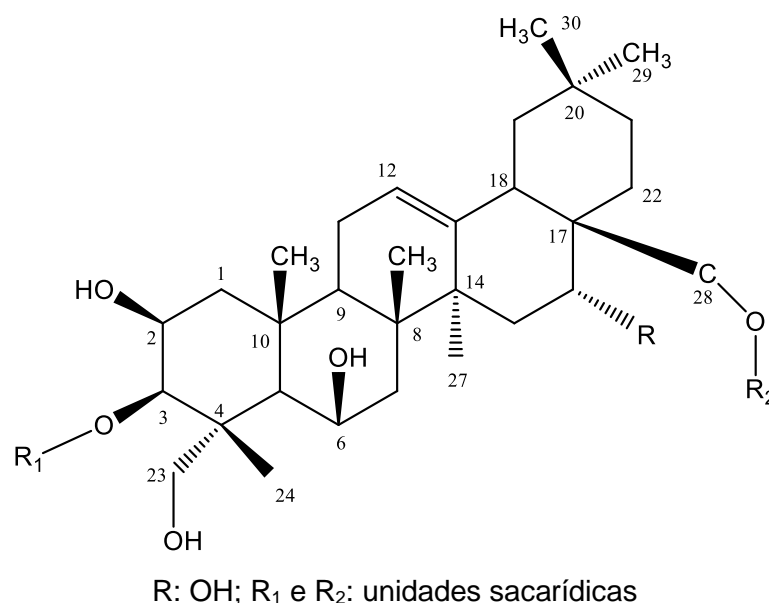
Os dados de elucidação obtidos para o composto **1'** são condizentes com aqueles reportados por MATSUNAMI et al. (2009) e por WANG et al. (1998) que isolaram esse composto de folhas de *Macaranga tanarius* e *Salvia officinalis*, respectivamente.

Os compostos isolados nos tempos de retenção de 18 a 19 min (**2'**, **3'**, **4'**, e **5'**) apresentaram semelhanças quanto à sua estrutura. Os dados de RMN e HRESITOFMS obtidos sugerem se tratar de saponinas triterpênicas glicosídicas. A atribuição dos deslocamentos químicos da aglicona e dos glicosídeos foi feita a partir das análise de RMN de ^1H e experimentos de COSY, em conjunto com os espectros de RMN de ^{13}C e das correlações H-C nos espectros HSQC. A sequência e os pontos de ligação entre as cadeias sacarídicas foram estabelecidos a partir das correlações nos experimentos de HMBC. Os dados obtidos foram confirmados por comparação com aqueles existentes na literatura.

Nos experimentos de RMN uni e bidimensionais foram identificadas cadeias com 63, 69, 64 e 58 carbonos para os compostos **2'**, **3'**, **4'** e **5'**,

respectivamente, dos quais 30 pertencem à aglicona triterpênica e os demais correspondem aos carbonos sacarídicos. Os quatro compostos apresentaram seis carbonos quaternários sp^3 em δ 16,5, 19,1 ($\pm 0,1$), 19,4, 24,1 ($\pm 0,1$), 26,3 ($\pm 0,2$) e 33,6 e dois carbonos de hibridização sp^2 em δ 124,2 ($\pm 0,1$) e 144,2 ($\pm 0,1$) acoplados, respectivamente a seis prótons com singletos metílicos e ao próton vinílico em δ 5,33 ($\pm 0,01$) indicando que se trata de uma aglicona com esqueleto olean-12-eno (SAHU et al., 1995) (Figura 30).

Figura 30: Aglicona identificada para os compostos **2'**, **3'**, **4'** e **5'** isolados de *M. commersonii*.



Eskander e colaboradores (2005) afirma que a aglicona das saponinas é classificada de acordo com os valores dos deslocamentos relacionados à 2H-16 e C-16. Tem-se um ácido protobassico com deslocamentos de δ 2H-16 em 1,66 e 2,06 ($\pm 0,03$) ppm e δ C-16 em 23,8 ppm, já o ácido 16 α -OH-protobassico é caracterizado pela presença dos deslocamentos de δ H-16 em 4,5 ($\pm 0,02$) ppm e δ C-16 em 74,7 ppm.

Em nosso estudo obtivemos os seguintes valores para 2H-16 e C-16 dos compostos isolados: **2'** (2H-16 de δ 2,02 e 1,66 e C-16 δ 23,9), **3'** (2H-16 de δ 2,04 e 1,63 e C-16 δ 23,8), **4'** (2H-16 de δ 2,02 e 1,64 e C-16 δ 23,9) e **5'** (2H-16 de δ 2,03 e 1,64 e C-16 δ 23,5). Assim, todas as agliconas têm características de ácidos protobassicos. Os dados espectrais obtidos em nosso estudo foram condizentes

com aqueles descritos por Lavaud e colaboradores (1996) na identificação de saponinas de três espécies do gênero *Mimusops*.

O ácido protobassico foi obtido pela primeira vez da semente de *Madhuca longifolia* L. (syn, *Bassia longifolia* L.) (Sapotaceae) (YOSIOKA; INADA; KITAGAWA, 1973). É um triterpeno pentacíclico derivado do ácido oleanólico a partir da introdução de grupos OH nas posições 2, 6 e 23. Ácidos protobassicos glicosídicos são encontrados exclusivamente em Sapotáceas o que os torna marcadores químicos dessa espécie (ESKANDER et al., 2006; LAVAUD et al., 1996; MASSIOT et al., 1990), enquanto que ácidos 16- α -hidroxiprotobassico glicosídicos têm sido encontrados em outras famílias vegetais (ESKANDER et al., 2006).

Nas saponinas isoladas os sinais de ^{13}C de C-3 e C-28 apresentaram-se em 83,7 ($\pm 0,1$) e 177,9 ($\pm 0,2$) ppm. Os altos valores de deslocamento nos dois casos são decorrentes da formação do éter em C-3 e da esterificação do ácido em C-28, ambos pelo acréscimo das unidades de açúcar (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005). Dados de HMBC confirmaram a relação entre os C-28 ($177,9 \pm 0,2$ ppm) e os prótons anoméricos da primeira unidade de açúcar ($5,5 \pm 0,1$ ppm) da sequência de oligossacarídeos, em todos os compostos isolados. Esses resultados corroboram estudos anteriores realizados com saponinas protobassicas isoladas de *Mimusops laurifolia* (ESKANDER et al., 2005, 2006; LAVAUD et al., 1996).

As saponinas, de um modo geral, são categorizadas de acordo com o número de cadeias sacarídicas em sua estrutura. Saponinas monodesmosídicas possuem apenas uma unidade açúcar, geralmente ligada a C-3. Bidesmosídicas têm dois substituintes glicosídicos, geralmente em C-3 através de uma ligação éter e outra cadeia em C-28 formando um éster ou ainda uma ligação éter em C-26 (GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAĞ; MAZZA, 2007). Assim podemos inferir que em nosso estudo as saponinas isoladas são do tipo bidesmosídicas.

Nos compostos **2'**, **4'** e **5'**, os substituintes ligados ao éter glicosídico em C-3 foram identificados como uma unidade de β -D-glicose devido à presença de um dubleto de próton anomérico (H-1) em δ 4,45 ($\pm 0,1$), com J de 7,7 ($\pm 0,2$) Hz e carbono anomérico (C-1) em δ 105,4. Caracterizando ácidos 3-O- β -glicopiranosilprotobassicos (CHEN et al., 2015). Na Tabela 7 estão apresentados os valores de δ_{H} e δ_{C} e as constantes de acoplamento para as porções sacarídicas ligadas a C-3.

A proposição da configuração do açúcar baseou-se na observação do alto valor para as constantes de acoplamento $^3J_{H-1-H-2}$ (7-8 Hz) correspondentes ao próton em posição axial, predominantes na glicose. Além disso, os protons anoméricos nas quatro moléculas apresentam correlação por HMBC com o C-3 da aglicona (δ 83,8).

Tabela 7: Dados de RMN (^1H e ^{13}C) para a porção sacarídica C-3 das saponinas **2'**, **3'**, **4'** e **5'** (CD_3OD 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C).

Átomo	2		3		4		5	
	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C}
<i>3-O-β-D-glicose</i>								
1	4.45 (d, 7.6)	105.4	4.46 (d, 8.8)	105.4	4.44 (d, 7.9)	105.4	4.44 (d 7.7)	105.4
2	3.29 (t, 8.8)	75.5	3.34 (t, 8.8)	75.5	3.29 (t, 8.5)	75.5	3.29 (m)	75.5
3	3.36 (m)	78.3	3.49 (m)	76.8	3.36 (m)	78.3	3.36 (m)	78.3
4	3.37 (m)	71.2	3.55 (m)	79.2	3.37 (m)	71.1	3.37 (m)	71.2
5	3.27 (m)	77.8	3.39 (m)	76.6	3.29 (m)	77.9	3.27 (m)	77.8
6	3.71 (dd, 11.9, 4.5)	62.4	3.72 (m)	62.4	3.71 (m)	62.4	3.70 (dd, 10.6, 4)	62.4
6	3.81 (dd, 11.9, 2.1)		3.81 (m)		3.82 (m)		3.81 (dd 11.7, 2.5)	
<i>β-D-apiose (em C-3Glc)</i>								
1			5.09 (d, 2.9)	111.2				
2			3.92 (m)	77.8				
3				80.3				
4			3.82 (m)					
4			4.15 (d, 8.8)	75.0				
5			3.53 (d, 11.7)					
5			3.56 (d, 11.7)	64.8				

A saponina **3'** apresentou dois carbonos anoméricos em δ 105,4 e 111,1 e seus dois prótons correspondentes, com um dubleto a δ 4,46 (8,8 Hz) e outro a δ 5,09 (2,9 Hz), que correspondem aos açúcares β -D-glicose e β -D-eritroapiofuranose (apiose), respectivamente (Tabela 7). Os dados de HMBC confirmaram a formação da cadeia entre os dois açúcares, por meio das relações interglicosídicas de C-1 da apiose (δ 111,1) e o H-4 da glicose (δ 3,55) e entre C-4 da glicose (δ 79,2) e o H-1 anomérico da apiose (δ 5,09). A ligação da cadeia à aglicona foi confirmada pela relação de C-3 da aglicona (δ 83,8) com o carbono anomérico da glicose (δ 4,46), semelhante aos compostos anteriormente descritos (Tabela 7).

Na Tabela 8 estão apresentados os deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento correspondentes à porção oligossacarídica ligada à C-28 dos compostos isolados em nosso estudo. Para os compostos **2'**, **4'** e **5'** tem-se como primeiro sacarídeo da cadeia, uma β -D-xilose [δ_{H-1} 5,47 \pm 0,03 (d, J = 6,4 \pm 0,3 Hz), δ_{C-1} 95,5]. A posição axial de H-1 anomérico é determinada pelo alto valor da constante de acoplamento.

Para o composto **3'** o primeiro açúcar foi identificado como α -L-arabinose com as seguintes atribuições: δ_{H-1} 5,50 (d, J = 4,4 Hz), δ_{C-1} 95,5. O menor valor da constante comprova a presença do H-1 anomérico em posição equatorial (LAVAUD et al., 1996). A confirmação da ligação entre os açúcares iniciais e as agliconas correspondentes foi feita por experimentos de HMBC com a relação entre δ_{H-1} 5,47 \pm 0,03 e δ_{C-28} 177,9 (\pm 0,2) nos quatro compostos isolados.

O espectro de alta resolução (ESITOFMS) para o composto **2'** apresentou íon pseudomolecular em m/z = 1399.6382 $[M+FA-H]^-_{exp.}$ (com m/z = 1399.6382 $[M+FA-H]^-_{calcd.}$) com fórmula bruta $C_{63}H_{103}O_{31}$ que determina a sua fórmula molecular $C_{63}H_{102}O_{31}$ e massa de 1354.

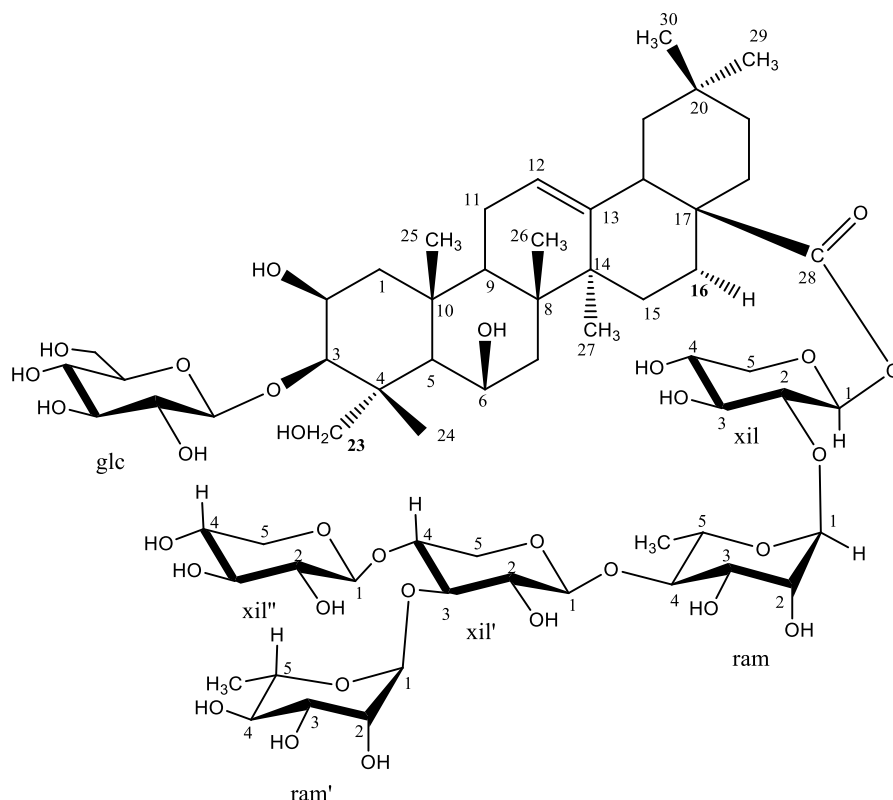
Os dados de RMN 1H e ^{13}C para o composto **2'** (Figura 31) mostraram os seguintes deslocamentos químicos para os carbonos anoméricos da cadeia oligossacarídica: δ 95,5, 101,5, 107,1, 102,3 e 103,4, os quais corresponderam no HSQC aos respectivos prótons anoméricos: 5,47 (d, J = 6,4 Hz), 5,37 (d, J = 1,2 Hz), 4,53 (d, J = 7,6 Hz), 5,17 (d, J = 1,5 Hz) e 4,26 (d, J = 7,6 Hz) (Tabelas 7 e 8). Os prótons anoméricos com maiores constantes de acoplamento (\sim 6,4 Hz) decorrem da posição axial, nesse caso, ela é característica do açúcar α -L-xilose, já os oligossacarídeos do tipo β -D-ramnose apresentam H-1 em posição equatorial, que justifica o menor valor das suas constantes de acoplamento (1,2 e 1,5 Hz).

A sequência das unidades de açúcar e suas ligações O-glicosídicas em C-28 foi estabelecida para o composto **2'** a partir das correlações observadas no espectro de HMBC. O H-1 da xilose terminal (δ 4,26) liga-se ao C-4 da xilose média (74,9), o H-1 da ramnose terminal (δ 5,17) liga-se ao C-3 da mesma xilose (δ 80,4), esta por sua vez tem seu H-1 (δ 4,53) ligado ao C-4 (δ 84,2) da ramnose interna e esta se liga por meio do H-1 (δ 5,37) ao C-2 (δ 76,5) da xilose inicial.

Assim, tem-se o composto: ácido 3-O-(β -D-glicopiranosil)-28-O-(α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)-[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 4)]- β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-xilopiranosil) protobassico (Figura 31). Esses dados são

condizentes com aqueles reportados na literatura por Eskander e colaboradores (2005) no isolamento do mesmo composto de folhas de *M. laurifolia*.

Figura 31: Estrutura do composto **2'** isolado de *M. commersonii*.



O composto **3'** apresentou uma cadeia pentaglicosídica na porção ligada a C-28 formada por duas pentoses (α -L-arabinose e β -D-xilose) e três α -L-ramnoses. Os deslocamentos químicos correspondentes aos carbonos anoméricos foram δ 95,5, 101,7, 105,4, 104,2, e 102,8 com seus prótons correspondentes: δ 5,50 (d, $J = 4,4$ Hz), 5,29 (m), 4,57 (d, $J = 8,8$ Hz), 5,09 (d, $J = 2,9$ Hz) e 5,12 (d, $J = 7,6$ Hz).

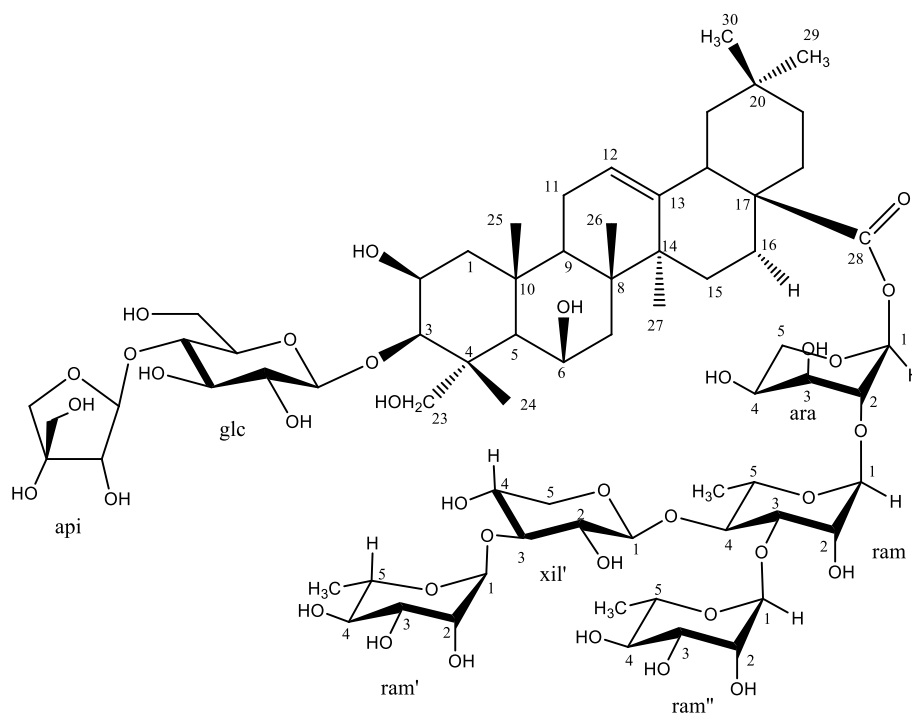
A sequência de oligossacarídeos em C-28 para o composto **3'** foi: H-1' da ramnose terminal (δ 5,12) liga-se ao C-3 da xilose média (δ 85,2) e essa por sua vez se liga ao C-4 da ramnose média (δ 78,0) por meio do H-1 (δ 4,57). Outra ramnose se liga à ramnose média na posição C-3 (δ 80,4) por meio de H-1 (δ 5,09), e o H-1 da ramnose média (δ 5,29) se liga à arabinose inicial em C-2 (δ 76,9).

Tabela 8: Dados de RMN para as porções oligossacarídicas em C-28 para as saponinas 2', 3', 4' e 5' (CD₃OD 500 MHz ¹H e 125 MHz ¹³C).

Átomo	(2) δ_H (J in Hz)	δ_C	(3) δ_H (J in Hz)	δ_C	(4) δ_H (J in Hz)	δ_C	(5) δ_H (J in Hz)	δ_C
28-O-α-L-arabinose (ester)								
1			5.50 (d, 4.4)	95.5				
2			3.60 (m)	76.9				
3			3.94 (m)	n.d.				
4			n.d.	66.7				
5			n.d.	n.d.				
5			3.92 (m)					
28-β-D-xilose (ester)								
1	5.47 (d, 6.4)	95.5			5.50 (d, 6.1)	95.5	5.45 (d, 6.6)	95.5
2	3.61 (m)	76.5			3.60 (m)	77.0	3.61 (t, 7.3)	76.4
3	3.55 (m)	77.8			n.d.	76.9	3.56 (m)	77.8
4	3.52 (m)	71.2			n.d.	n.d.	3.53 (m)	71.1
5	3.29 (m)	66.9			3.33	66.7	3.30 (m)	69.9
5	3.89 (dd 11.6, 4.8)				3.95		3.91 (5.1, 11.7)	
α-L-ramnose (at C-2 Xil)								
1	5.37 (d, 1.2)	101.5	5.29 (brd)	101.7	5.28 (d, 1.8)	101.7	5.40 (d, 1.1)	101.3
2	3.94 (3.3, 1.5)	72.5	4.02 (brd)	72.3	4.02 (dd, 3.0, 1.8)	72.3	3.94 (dd 3.1, 1.7)	72.3
3	3.87	72.5	3.91	80.4	3.92 (m)	80.7	3.86 (dd, 11.7,	72.5
4	3.56	84.2	3.74	78.0	3.74 (m)	78.6	3.55 (m)	84.4
5	3.79	69.0	3.81	69.4	3.82 (m)	69.4	3.80 (m)	69.0
6	1.27 (d, 6.4)	18.4	1.27	18.1	1.26 (d, 6.1)	18.0	1.28 (m)	18.1
β-D-xilose' (em C-4 Rha)								
1	4.53 (d, 7.6)	107.1	4.57 (d, 8.8)	105.4	4.50 (d, 7.2)	105.4	4.50 (d, 8.0)	107.1
2	3.39	77.1	3.31	75.2	3.29 (m)	75.5	3.34	76.5
3	3.64 (t, 8.8)	80.4	3.42	85.2	3.41 (m)	85.2	3.46	84.4
4	3.73	74.9	3.57	70.3	3.55 (m)	71.0	3.54	69.8
5	3.30	64.7	3.18	67	3.19 (t, 9.7)	67.0	3.22 (dd, 11,?)	67.3
5	4.05 (d, 6.7, 11.9)		3.88		3.88 (m)		3.89 (m)	
α-L-rhamnose' (term. em C-3 Xyl')								
1	5.17 (d, 1.5)	102.3	5.12 (brd)	102.8	5.12 (d 1.2)	102.8	5.14 (d, 1.4)	102.7
2	3.94	72.3	3.99 (m)	72.4	3.99 (m)	72.3	3.98 (3.1, 1.7)	72.3
3	3.74	72.3	3.72	72.3	3.72 (m)	72.3	3.72 (m)	72.3
4	3.37	74.2	3.42	74.1	3.39 (m)	74.1	3.39 (t, 9.1)	74.1
5	4.22 (m)	69.7	3.97	70.3	3.97 (m)	70.3	4.0 (m)	70.2
6	1.22 (d, 6.4)	18.2	1.27 (d, 5.8)	18.1	1.26 (d, 6.1)	18	1.28 (m)	18.1
α-L-ramnose''								
1			5.09 (brd, 2.9)	104.2	5.08 (d, 1.22)	104.2		
2			4.08 (brd)	72.2	4.06 (d, 1.22, 3.05)	72.3		
3			3.76	72.3	3.74 (m)	72.3		
4			3.42	74.1	3.41	74.1		
5			3.82	70.2	3.81	70.5		
5			1.27	18.1	1.27 (d, 6.10)	18.0		
β-D-xilose'' (em C-4 Xil')								
1	4.26 (d, 7.6)	103.4						
2	3.16 (m)	75.1						
3	3.28 (m)	78.1						
4	3.52	71.2						
5	3.16 (t, 10,3)	67.1						
5	3.87							

Os dados de HRESITOFMS de **3'** mostraram se tratar de composto com fórmula molecular $C_{69}H_{112}O_{35}$ e massa de 1500, partindo da fórmula bruta $C_{69}H_{111}O_{34}$ que resulta do aducto $[M-H_2O+H]^+_{exp.}$ com $m/z = 1483,6919$ (com $m/z = 1483,6957$ $[M-H_2O+H]^+_{calcd}$). O íon em modo negativo não foi detectado porque se encontrava fora da janela espectral utilizada (máx. 1500 Da). A partir dos dados obtidos o composto **3'** foi identificado como: ácido 3-O-(β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 4) - β -D-glicopiranosil)-28-O-[α -L-ramnopiranosil - (1 \rightarrow 3) - β -D-xilopiranosil (1 \rightarrow 4) - [α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)-] α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranosil] protobassico (Figura 32). Esse composto foi identificado nas folhas de *M. laurifolia* (ESKANDER et al., 2005).

Figura 32: Estrutura do composto **3'** isolado de *M. commersonii*

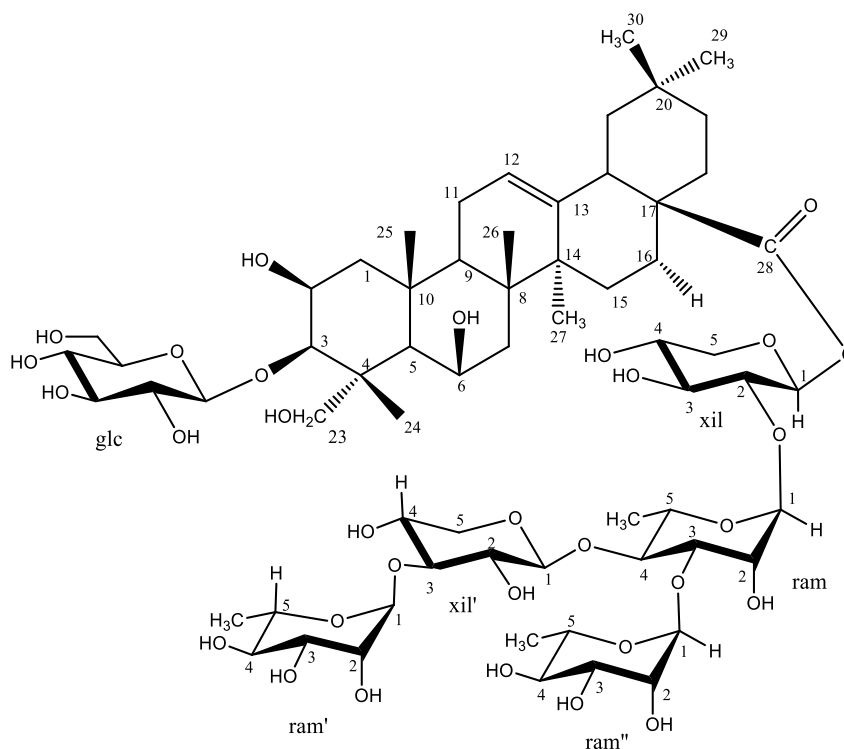


Os dados de HRESITOFMS para o composto **4'** mostraram o íon pseudomolecular em $m/z = 1413,6597$ $[M+FA-H]^-_{exp.}$ (com $m/z = 1413,6558$ $[M+FA-H]^-_{calcd}$) resultando na fórmula bruta $C_{65}H_{105}O_{33}$ e consequente fórmula molecular $C_{64}H_{104}O_{31}$ com MM = 1368,6597. Esta fórmula molecular foi semelhante à do composto Mimusopina, identificado por SAHU et al., (1995) em estudos com folhas de *Mimusops elengi*.

Há uma diferença sutil na sequência glicosídica para o composto **4'** quando comparado à mimusopina. O açúcar inicial da cadeia ligada a C-28 da mimusopina foi identificado como α -L-arabinose [δ_{H-1} 6,43 (s), δ_{C-1} 92,9] (SAHU et al., 1995) diferente do açúcar encontrado em nosso estudo, uma β -D-xilose. Essa pentose foi comprovada pela presença do dubleto em 5,50 ppm com J de 6,8 Hz decorrente da posição axial do próton H-1. A correspondência entre H-1 e C-1 anomérico (δ 95,5) foi feita por HSQC e a relação de H-1 com C-28 (δ 178,3) foi comprovada por HMBC. Assim, os dados reportados para a mimusopina são semelhantes àqueles obtidos em nosso estudo para o composto **4'**, com exceção do açúcar inicial em C-28, o que comprova na verdade, não se tratar do mesmo composto.

A sequência glicosídica em C-28 para o composto **4'** foi: o H-1 da ramnose terminal (δ 5,12) se liga ao C-3 (δ 85,2) da xilose média, essa por sua vez se liga ao C-4 (δ 80,7) da ramnose média por meio de H-1 (δ 4,50), o H-1 de outra ramnose (δ 5,80) se liga ao C-3 (δ 80,7) da ramnose média e esta se liga através de H-1 (δ 5,28) à xilose inicial na posição C-2 (δ 76,9) (Figura 33).

Figura 33: Estrutura do composto **4'** isolado de *M. commersonii*.



O composto **4'** foi identificado como ácido 3-O-(β -D-glicopiranosil)-28-O-(α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-xilopiranosil-(\rightarrow 4)[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)]- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-xilopiranosil) protobassico, e é semelhante ao composto isolado em estudos realizados por Eskander e colaboradores (2005).

A partir das análises de HRESITOFMS para o composto **5'**, sua fórmula molecular foi definida como $C_{58}H_{94}O_{27}$ com massa correspondente de 1222. Os dados foram obtidos a partir da fórmula bruta de $C_{58}H_{94}O_{26}$ com íon pseudomolecular em $m/z = 1205,5983$ $[M-H_2O+H]^+_{exp.}$ (com $m/z = 1205,5955$ $[M-H_2O+H]^+_{calcd.}$). Esses dados são semelhantes àqueles obtidos para a Mi-saponina A, composto isolado de *Madhuca longifolia* e presente em uma variedade de espécies da família Sapotaceae, sendo visto como um marcador para as espécies do gênero *Mimusops* (BALIGA et al., 2011; ESKANDER et al., 2006; LAVAUD et al., 1996).

Nossos dados de RMN de 1H e ^{13}C , no entanto, comprovam que a saponina isolada não se trata da Mi-saponina A. O composto **5'** apresentou padrão semelhante ao marcador, no entanto a diferença está no açúcar inicial da cadeia glicosídica em C-28, visto que no composto **5'** se trata de uma β -D-xilose [δ_{H-1} 5.45 (d, $J = 6.6$ Hz), δ_{C-1} 95.5], diferente da Mi-saponina A que apresenta uma α -L-arabinose no início da sua cadeia oligossacarídica com δ_{H-1} 5,64 (d, $J = 4$ Hz) e δ_{C-1} 94,0. A sequência glicosídica para nosso composto foi determinada como: H-1' da ramnose (δ 5,14) ligada à C-3' da xilose média (δ 84,4) e esta se liga ao C-4 (δ 84,4) da ramnose média por meio do H-1 (δ 4,50) e por fim, O H-1 da ramnose média (δ 5,40) correlaciona-se ao C-2 (δ 76,4) da xilose inicial.

Assim o composto **5'** foi definido como: ácido 3-O-(β -D-glicopiranosil)-28-O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-xilopiranosil] protobassico (Figura 34).

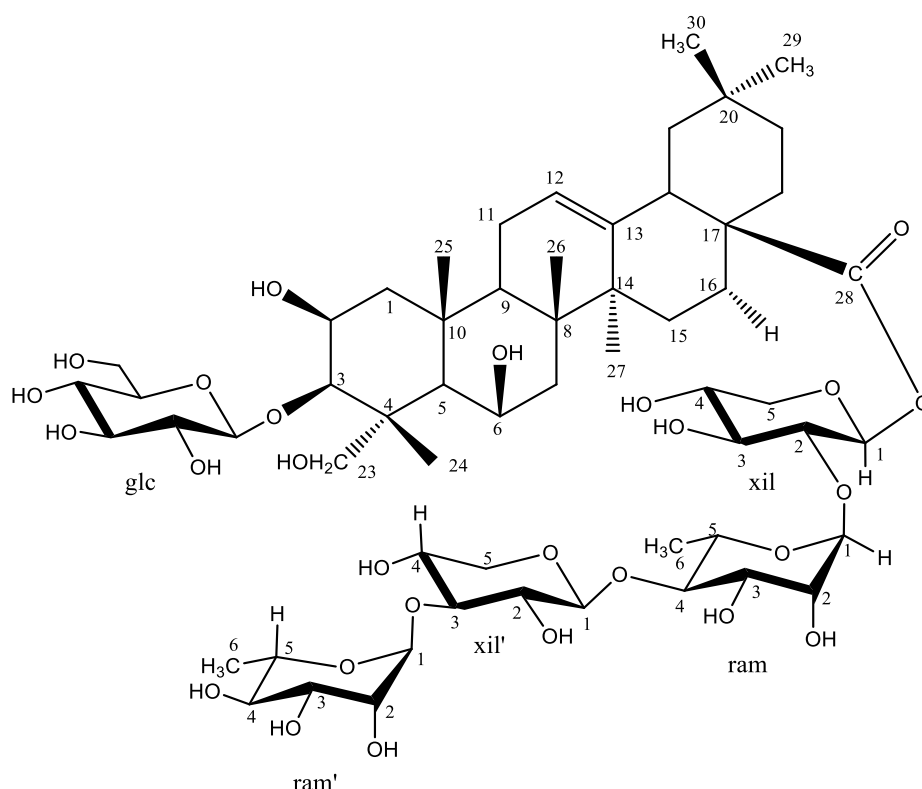
A saponina **5'** apresentou semelhança também com o composto sideroxilosídeo A, isolado das raízes de *Sideroxylon cubense* (JIANG et al., 1994). Porém, observando os dados de RMN publicados para o sideroxilosídeo A observa-se uma grande diferença no deslocamento químico do C-2 xilose inicial, que apresenta δ 80,5 na referência versus δ 76,4 para o composto **5'**. (com δ 76,5 para C-2' da xilose média). Como não há uma comparação experimental direta não podemos concluir que o composto **5'** é de fato o sideroxilosídeo A. No entanto, o composto **5'** foi semelhante à saponina isolada de *Tridesmostemon claessenssi*

(MASSIOT et al., 1990) e ao composto identificado em folhas de *M. laurifolia* por Eskander e colaboradores (2005).

Saponinas glicosídicas com cadeia éster contendo o ácido tetrassacarídico do tipo [α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-xilopiranosil] são raras. Em contraste, aquelas com ácido do tipo [α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-xilopiranosil(1 \rightarrow 4)- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranosil] têm grande ocorrência em saponinas isoladas de espécies das famílias Sapotaceae, Verbenaceae, Lamiaceae e Curcubitaceae (ESKANDER et al., 2005).

Isso nos leva a crer que em nosso estudo identificamos três ácidos protobassicos (**2'**, **4'** e **5'**) com a unidade glicosídica de rara ocorrência entre as Sapotáceas, sendo este o primeiro estudo que reporta a identificação de saponinas triterpênicas glicosídicas na espécie *M. commersonii*.

Figura 34: Estrutura do composto **5'** isolado de *M. commersonii*.

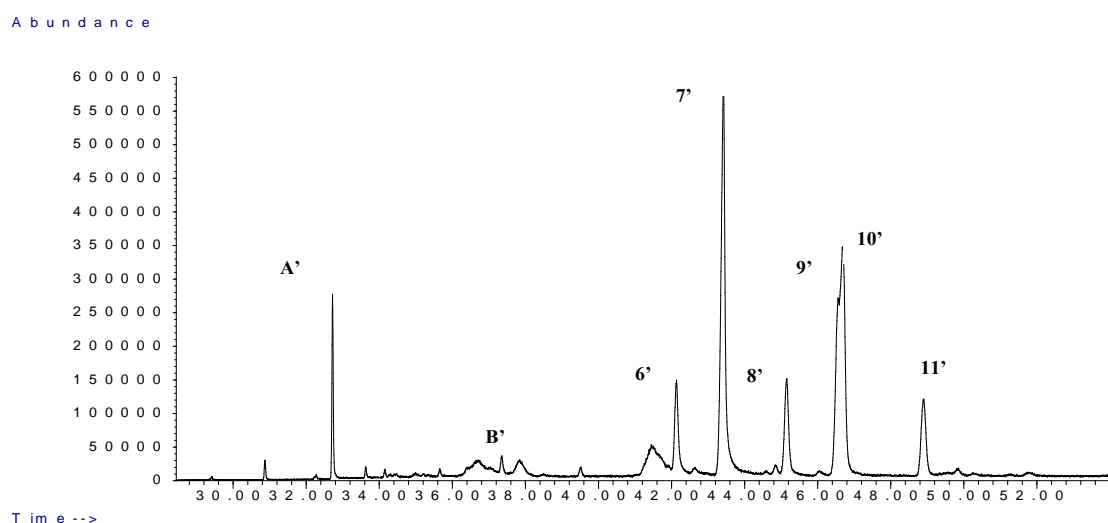


3. Avaliação da composição química da FMePMc por CG-EM

A partir das análises por CG-EM da FMePMc, assim como observado na espécie *M. zapota*, verificou-se a predominância dos compostos triterpênicos pentacíclicos com padrão de fragmentação de compostos das séries ursano e oleano (ver Figuras 18 e 19 no Capítulo 3) nos tempos de retenção entre 42 e 49 min, totalizando 75,5% da fração FMePMc (Figura 35).

A Tabela 9 apresenta os compostos identificados a partir de seus padrões de fragmentação, comparados com os dados da biblioteca NIST 11 e dados descritos na literatura. Os compostos **A'** e **B'** correspondem ao esqualeno e ao α -tocoferol respectivamente. A presença desses compostos foi relatada em estudos anteriores em espécies do gênero *Mimusops* (KADAM et al., 2012; MISRA; NIGAM; MITRA, 1969).

Figura 35: Cromatograma expandido (30 a 50 min) da fração de menor polaridade das folhas de *M. commersonii* (FMePMc).



O composto **6'**, foi identificado como β -amirina com a presença do padrão de fragmentação característico (m/z 218, 203 e 189 com fragmentação do anel C tipo Retro-Diels-Alder (BUDZIKIEWICZ; WILSON; DJERASSI, 1963; SHUI; WONG; LEONG, 2004; ZANON et al., 2008) A maior abundância do pico em m/z 203 confirmou tratar-se de um composto com esqueleto olen-12-eno (Anexo 49).

O composto **7'** (MM= 426) apresentou-se majoritário na FMePMc com padrão de fragmentação similar ao do composto **6'**, no entanto os fragmentos m/z 203 e 189 apresentaram abundância semelhante, típica de compostos com

esqueleto do tipo ursan-12-eno (RHOURRI-FRIH et al., 2013). Este composto foi identificado como α -amirina (Anexo 50).

O espectro de massa do composto **8'** (MM= 426) também apresentou o padrão característico da fragmentação Retro-Diels-Alder com pico base em m/z 218, uma maior abundância do m/z 203 em relação a m/z 189, característica de compostos triterpenos pentacíclicos pertencentes à série Δ -12- oleanos, além do fragmento característico da perda da porção acetil (m/z 408) e do fragmento em m/z 43 (COCH_3^+) Este composto foi identificado como acetato de β -amirina (Anexo 51).

A separação dos compostos **9'** e **10'** não foi eficiente por cromatografia a gás e porcentagem relativa correspondeu ao somatório de ambos os compostos, no entanto, a identificação foi realizada.

Tabela 9: Análise CG-EM da composição química da fração de menor polaridade de folhas de *M. commersonii*.

Tipo	T _R ^a (min)	Composto ^b	m/z	Fórmula molecular	Composição relativa ^c (%)
A'	32,72	Esqualeno	410	C ₃₀ H ₅₀	14.61
B'	37,34	α -tocoferol	430	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	2.18
6'	42,36	β – amirina	426	C ₃₀ H ₅₀ O	6.52
7'	43,12	α – amirina	426	C ₃₀ H ₅₀ O	29.52
8'	45,15	Acetato de β – amirina	468	C ₃₂ H ₅₂ O ₂	7.32
9'	46,54	Acetato de α -amirina	468	C ₃₂ H ₅₂ O ₂	32.13
10'	46,68	Acetato de lupeol	468	C ₃₂ H ₅₂ O ₂	
11'	48,89	Acetato de cicloartenol 24- metileno	482	C ₃₅ H ₅₄ O ₂	6.65

^a Tempo de retenção

^b Compostos listados em ordem de eluição na coluna capilar HP-5MS.

^c Porcentagem baseada na área do pico.

A análise do EM do composto **9'** (MM= 468) apresentou pico base em 218 e semelhança na abundância dos fragmentos m/z 203 e 189, característica dos triterpenos pentacíclicos da série Δ -12-ursano. (ALI; BHUTANI; SRIVASTAVA, 1990; BUDZIKIEWICZ, WILSON. DJERASSI, 1963) Também foram observados os

fragmentos característicos da perda de porção acetil. Esse composto foi identificado como acetato de α -amirina (Anexo 52).

O composto **10'** (MM= 468) apresentou picos oriundos da fragmentação do tipo Retro-Diels-Alder do anel C (m/z 218; 207; 203 e 189). Destes, os mais intensos foram m/z 189 e 207, que são característicos da fragmentação de compostos do tipo lupeno (OGUNKOYA, 1981). Os fragmentos correspondentes à perda da porção acetil também estão presentes (m/z 408, 453), assim esse composto foi identificado como acetato de lupeol (Anexo 53).

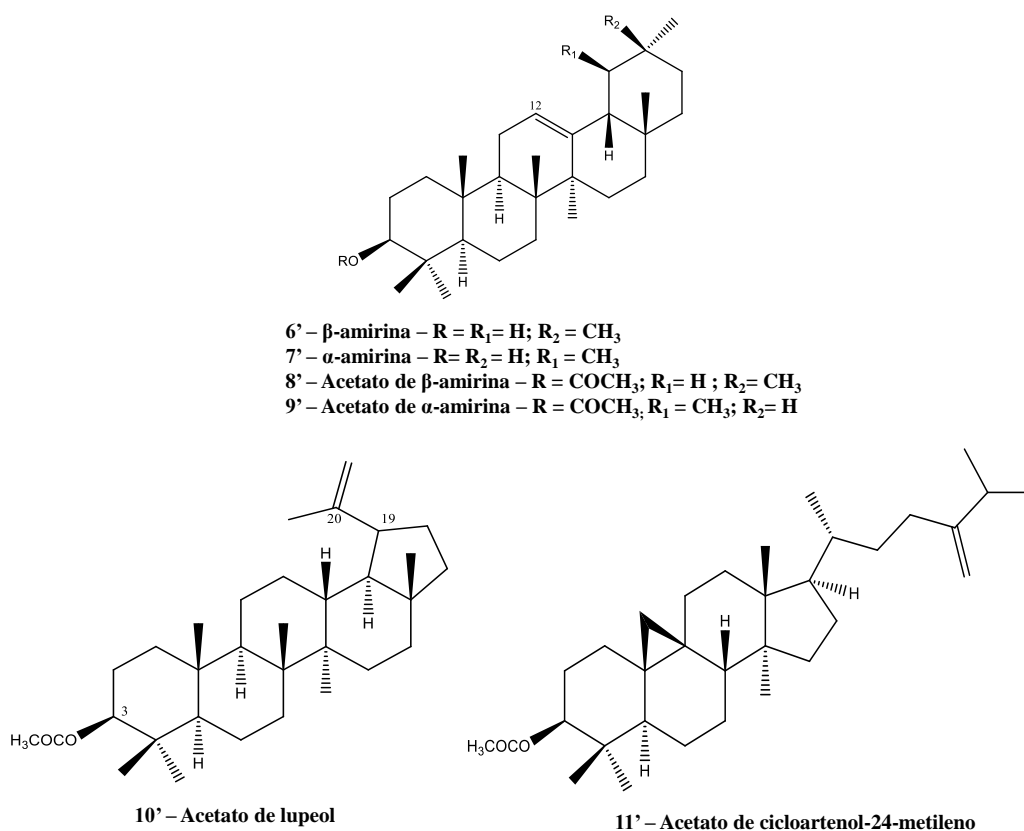
O composto **11'** (MM = 482) foi identificado como acetato de cicloartenol-24-metileno com a presença dos fragmentos em m/z 409 e 191, característicos do cicloartenol (SHUNYAN MO, LINLIN DONG, 2013). Os fragmentos em m/z 467 e 422 resultaram da perda de CH_3 e CH_3COOH , respectivamente a partir do íon molecular. O fragmento em m/z 379 corresponde à perda do radical isopropil (m/z 43) a partir de m/z 422 na cadeia alifática ligada ao ciclopentano (anel D) (Anexo 54). As estruturas dos compostos **5**, **6'**, **7'**, **8'**, **9'**, **10**, e **11'** identificados nas análises de CG-EM da FMePMc estão apresentadas na Figura 36.

A presença de β -amirina está documentada tanto na família Sapotaceae (DE OLIVEIRA et al., 2014; FAYEK et al., 2013; FERNANDES et al., 2013) quanto no gênero *Mimusops* em revisões de literatura tais como “Studies on *Mimusops* sp” e “*Mimusops elengi*: A Review on ethnobotany, phytochemical and pharmacological profile” realizadas por Misra, Nigam e Mitra (1974) e Kadam et al. (2012), respectivamente.

Os compostos α , β -amirina e seus acetatos são encontrados em grande variedade de Sapotáceas, tais como *M. zapota* (FAYEK et al., 2013), *M. subsericea* (FERNANDES et al., 2013), *Manduca longifolia* (SUNITA; SAROJINI, 2013) *Pouteria gardineri* (SILVA, 2007) e também estão presentes no gênero *Mimusops* (KADAM et al., 2012; MISRA; NIGAM; MITRA, 1974) dos quais são marcadores quimiotaxonômicos (FERNANDES et al., 2013).

O acetato de lupeol foi descrito juntamente com o acetato de β -amirina no látex de *M. balata* (*M. commersonii*) em estudos realizados por Misra, Nigam e Mitra (1974) e em outras espécies da família Sapotaceae (FAYEK et al., 2013; SILVA; SIMEONI; SILVEIRA, 2009)

Figura 36: Estrutura química dos compostos detectados por CG-EM na fração de menor polaridade de folhas de *M. commersonii*.



Em um estudo realizado por Lawrie, McClean e Olubajo (1970) foram identificados na resina de *M. commersonii* (*M. balata*) os seguintes compostos: cicloartenol, cicloartenol-24-metileno, esqualeno, β-amirina e lupeol. O trabalho de Rhourri-frih e colaboradores (2013) reportam a identificação do esqualeno, lupeol, cicloartenol, β-amirina e α-amirina, da mesma resina. Nosso estudo corrobora ambos os trabalhos quanto à presença dos compostos: esqualeno, β-amirina, α-amirina e cicloartenol-24-metileno, no entanto a ordem de eluição foi semelhante àquela reportada pelo trabalho de Rhourri-frih e colaboradores (2013).

4. Testes de atividade anti-helmíntica *in vitro* frente ao *S. venezuelensis*

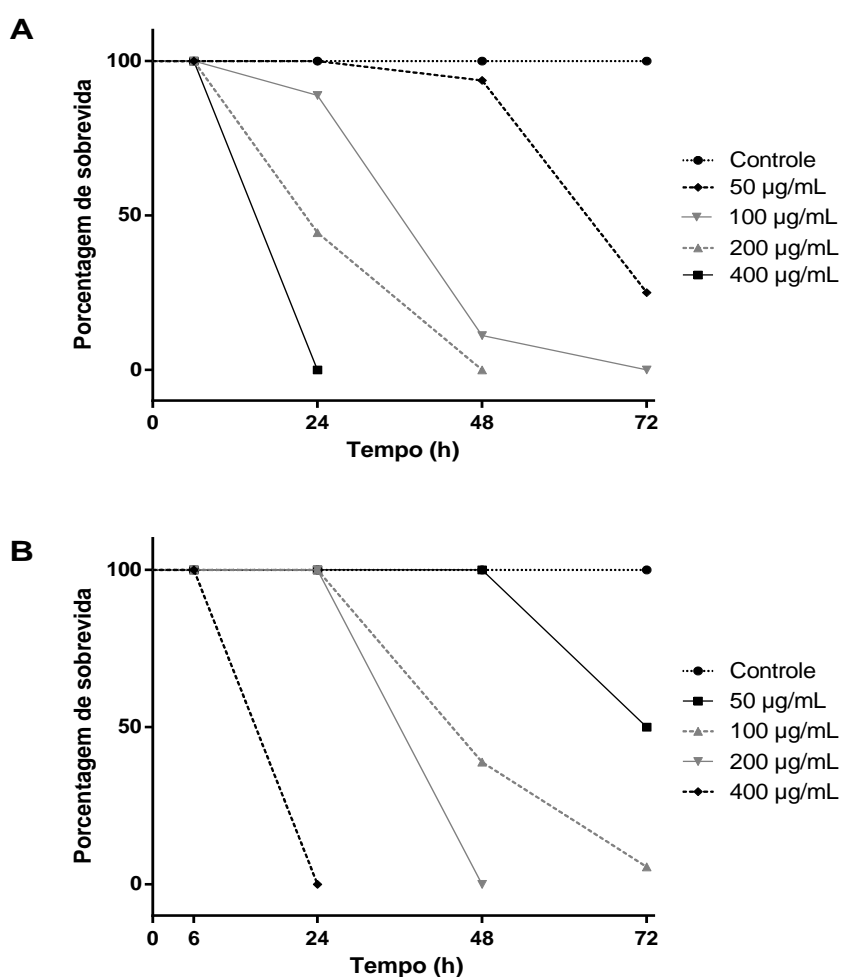
Para os testes de atividade antiparasitária *in vitro* frente ao *S. venezuelensis* as amostras foram incorporadas em PVP (1:4 m/m) a fim de melhorar a solubilidade no meio. O controle acrescido de PVP apresentou 100% de sobrevivência até o fim do estudo é válido ressaltar que os parasitas expostos à ivermectina apresentaram

redução da motilidade, no entanto sobreviveram durante as 72 horas de observação. A FMePMz, EHxActMc e o composto **2'** foram testados, mas não apresentaram nenhuma ação frente ao parasita nas concentrações avaliadas.

A porcentagem de sobrevivência dos parasitas expostos às amostras nas concentrações de 400, 200, 100 e 50 $\mu\text{g/mL}$ está apresentada nas Figuras 37 e 38.

Na concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$ o EEMc e FMaPMc foram letais em 24 horas. Observando os parasitas expostos ao EEMc, não houve sobrevivência em 200 e 100 $\mu\text{g/mL}$ em 48 horas, e ao fim do tempo de observação as amostras de 50 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram 25% de sobrevivência dos parasitas ao final de 72 horas (Figura 37A).

Figura 37: Atividade anti-helmíntica do extrato e fração inicial das folhas de *M. commersonii* frente ao *S. venezuelensis* em função do tempo de incubação.

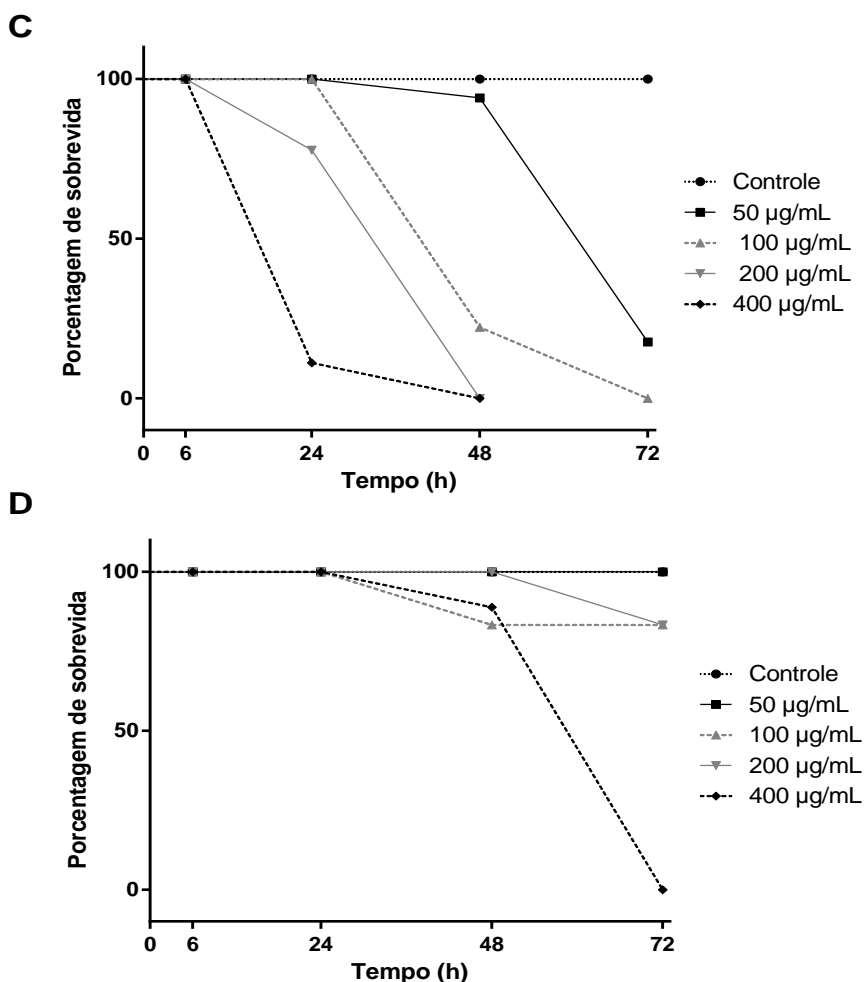


A: Porcentagem de sobrevivência dos parasitas expostos ao EEMc **B:** Porcentagem de sobrevivência dos parasitas expostos à FMaPMc.

A FMaPMc enriquecida em compostos fenólicos e saponinas foi letal na concentração 200 µg/mL em 48 horas, no entanto ao final do estudo as concentrações de 100 e 50 µg/mL apresentaram sobrevida dos parasitas de 5,5 e 50%, respectivamente (Figura 37B).

A F₂ oriunda da FMaPMc foi letal em 48 horas nas concentrações de 400 e 200 µg/mL, em 72 horas os parasitas expostos a 100 µg/mL também morreram, no entanto ao final de 72 horas a sobrevida de 17,6% dos parasitas foi observada na concentração de 50 µg/mL (Figura 38C).

Figura 38: Atividade anti-helmíntica da fração *M. commersonii* frente ao *S. venezuelensis* em função do tempo de incubação



C: Porcentagem de sobrevida dos parasitas expostos a F₂ **D:** Porcentagem de sobrevida dos parasitas expostos ao composto 4'.

A saponina isolada (**4'**) foi letal em 72 horas na concentração de 400 µg/mL, nas concentrações de 200, 100 e 50 µg/mL os parasitas apresentaram sobrevida de 83,0, 83,3 e 100%, respectivamente (Figura 38D).

Comparando a ação de todas as amostras testadas na concentração intermediária de 100 µg/mL o extrato etanólico e a F₂ foram letais em 72 horas de observação, houve sobrevida de 5,5 e 83,3% dos vermes expostos à FMaPMc e ao composto **4'**, respectivamente (Figura 39A). Na concentração intermediária de 200 µg/mL em 72 horas o extrato e as duas frações (FMaPMc e F₂) foram letais enquanto o composto **4'** mostrou sobrevida de 83% ao fim da observação (Figura 39B).

A partir da análise estatística das curvas de sobrevida (Teste de Mantel-cox) tem-se que elas foram estatisticamente diferentes entre si e em relação à curva do controle em um p valor < 0,0001.

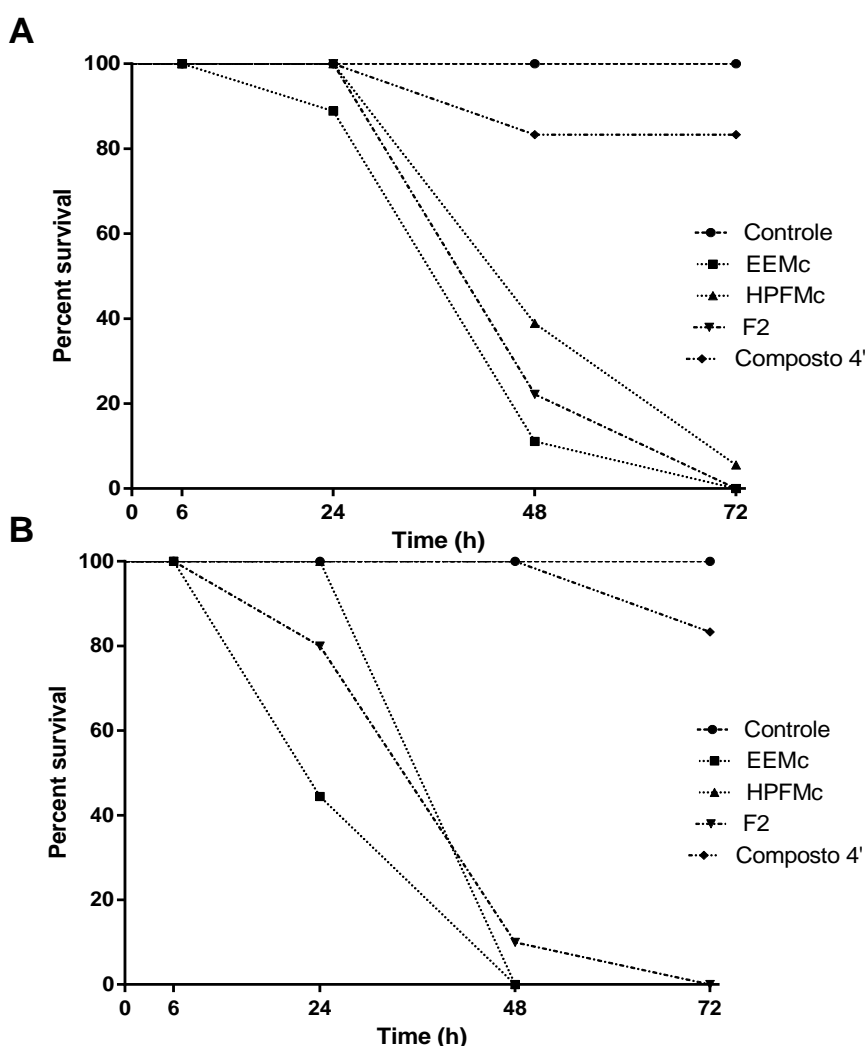
O uso de extratos vegetais como anti-helmínticos tem sido praticado em muitas culturas indígenas por séculos. Na verdade, em muitos países em desenvolvimento, a etnomedicina ainda é a principal opção de tratamento para muitas doenças parasitárias (TANNER et al., 2011). A ação anti-parasitária de espécies da família Sapotaceae têm sido reportada. Um estudo realizado por Desrivot et al., (2007) com plantas medicinais da Nova Caledônia mostrou que a espécie *Manilkara dissecta* apresentou ação frente à *Leishmania donovani* (IC₅₀= 13,4 µg/mL ± 1,1).

O gênero *Mimusops* também apresenta exemplares com essa função. A atividade moluscicida do extrato etanólico de cascas de *M. elengi* foi testada contra o caracol, *Limnaea acuminata*, hospedeiro intermediário da *Fasciola gigantica*, e apresentou notória atividade (LC₅₀ -15.0 µg/mL em 96 horas) (SINGH; SINGH; V. K. SINGH, 2012) O extrato metanólico de *M. elengi* e sua fração em acetato de etila foram testados frente a formas adultas de *Pheretima posthuma*. Os resultados indicaram que ambos exibiram atividade antihelmíntica significativa (JANA; DHANAMJAYARAO; VANI, 2010). Esses estudos sugeriram que a atividade dos extratos foi decorrente da presença de flavonoides e saponinas.

A amostra de melhor ação anti-helmíntica *in vitro* foi a F₂ obtida na separação da FMaPMc em coluna flash, uma vez que foi capaz de reduzir a sobrevida dos parasitas mesmo na concentração de 50 µg/mL (17,6%). A partir da observação da placa cromatográfica na Figura 27 B tem-se a presença marcante de

flavonoides e saponinas nesta fração. A saponina **4'** isolada em nosso estudo não apresentou ação efetiva quando comparada à F₂, sugerindo que a atividade anti-helmíntica da fração pode ser decorrente principalmente da presença dos flavonoides e das demais saponinas presentes. Não foram observadas alterações na superfície dos parasitas expostos aos produtos de *M. commersonii*.

Figura 39: Comparação da atividade anti-helmíntica de extrato, frações e compostos de folhas de *M. zapota* nas concentrações intermediárias do estudo.



A: concentração de 100 µg/mL; **B:** concentração de 200 µg/mL.

5. Efeito de extratos, frações e isolados de *M. commersonii* sobre queratinócitos humanos (HaCaT)

Os resultados para os testes *in vitro* sobre a linhagem celular HaCat, obtidos a partir do cálculo dos valores de TGI de EEMc, FMaPMc, F₂ e composto **4'** foram: 84,55, 217,69, >250 e 43,53 µg/mL, respectivamente.

A classificação proposta por Fouche et al. (2008 apud DELLA TORRE, 2013) classifica a atividade antiproliferativa em 4 categorias: (1) inativo (TGI > 50 µg/mL); (2) atividade fraca (15 µg/mL < TGI < 50 µg/mL), (3) atividade moderada (6,25 µg/mL < TGI < 15 µg/mL) e (4) atividade potente (TGI < 6,25 µg/mL).

Assim, podemos inferir que as amostras EEMc, FMPMc e F₂ foram inativas (TGI > 50 µg/mL) e o composto **4'** apresentou atividade antiproliferativa fraca (TGI = 43,53 µg/mL) sobre queratinócitos humanos.

6. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro*

As concentrações inibitórias mínimas (MICs) dos extratos, frações iniciais e compostos isolados de *M. commersonii* estão apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10: Concentração Inibitória Mínima (MIC) de extratos, frações iniciais e saponinas isoladas de *M. commersonii*.

Cepa	MIC (µg/mL)								Ctrl pos *
	EEMc	FMaPMc	FMePMc	2'	3'	4'	5'		
<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	16	64	16	>128	>128	>128	>128	8 ^a	
<i>T. rubrum</i> (SNB-TR1)	256	>512	128	>128	>128	>128	32	2 ^a	3.125x10 ^{-3b}
<i>S. aureus</i> (ATCC29213)	64	64	64	>128	8	>128	16	2 ^c	

* Controle positivo: ^a fluconazol; ^b itraconazol; ^c oxacilina.

EEMc: extrato etanólico, FMaPMc fração de maior polaridade; FMePMc fração de menor polaridade; (**2'**), (**3'**), (**4'**) e (**5'**): Saponinas isoladas de *M. commersonii*.

Foram considerados os valores utilizados por Holetz et al., (2002) para definir a potencialidade de extratos (MIC <0,1 mg/mL: atividade potente; MIC de 0,1 a 0,5 mg/mL: atividade moderada; MIC de 0,5 a 1 mg/mL: atividade fraca; MIC > 1 mg/mL: inativo).

O EEMc e a FMePMc apresentaram atividades semelhantes sendo potentes frente à *C. albicans* (16 µg/mL) e ao *S. aureus* (64 µg/mL) e moderadas frente ao *T. rubrum* (256 e 128 µg/mL, respectivamente). A fração de maior polaridade (FMaPMc) foi ativa contra *C. albicans* e *S. aureus* (64 µg/mL), com fraca atividade frente ao fungo dermatófito (>512 µg/mL) (Tabela 10).

Em um estudo realizado por Rangama e colaboradores (2009) o extrato etanólico de cascas de *M. elengi* demonstrou elevada atividade (MIC < 128 µg/mL) frente aos isolados de *Staphylococcus*, dentre esses o *S. aureus*. De acordo com os dados relatados para a espécie *M. elengi*, os extratos etanólicos das cascas apresentaram melhores resultados contra bactérias. (KADAM et al., 2012).

A presença de flavonoides e triterpenos análogos à α e β – amirina poderia justificar a ação proeminente dos extratos e frações iniciais de *M. commersonii* considerando que a atividade antimicrobiana desses compostos está bem documentada (FERNANDES et al., 2013; SINGH et al., 2014; SUNITA; SAROJINI, 2013).

A presença de triterpenos na FMePMc foi comprovada em nosso estudo. Tal fato pode justificar a ação efetiva da fração frente aos patógenos testados. Terpenos e terpenoides são ativos contra bactérias e o mecanismo de ação envolve a ruptura da membrana dos microrganismos (COWAN, 1999; RADULOVIĆ et al., 2013).

O composto **3'** mostrou uma potente atividade bactericida frente à *S. aureus* (8 µg/mL), no entanto não apresentou atividade antifúngica. Observando a estrutura da saponina isolada pode-se sugerir que a ação de **3'** frente à bactéria Gram-positiva pode estar ligada à presença da cadeia formada por apiose e glicose em C-3 e do éster contendo o ácido tetrassacarídico do tipo [α -L-ramnopiranosil-(1→3)- β -D-xilopiranosil(1→4)- α -L-ramnopiranosil- (1→2)- α -L-arabinopiranosil].

Como observado na elucidação estrutural, os compostos **2'** e **4'** possuem sequência glicosídica semelhante à do composto **5'** com a adição de açúcares à cadeia ligada a C-28, uma xilose e uma ramnose, respectivamente. Estes compostos no entanto, não apresentaram atividade antimicrobiana significativa, sugerindo que a presença de açúcares ligados à cadeia oligossacarídica principal em C-28 (ram-xil-ram-xil) reduz drasticamente a ação desses compostos.

O composto **5'** apresentou ação potencial contra *S. aureus* (16 µg/mL) e *T. rubrum* (32 mg/mL) (Tabela 10) . A ausência de açúcares ligados à cadeia

oligossacarídica em C-28 [α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-xilopiranosil (1 \rightarrow 4)- α -L-ramnopiranosil- (1 \rightarrow 2)- α -L-xilopiranosil] parece ser um fator determinante para a magnitude da ação antimicrobiana.

A atividade antibacteriana das saponinas está documentada (GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAĞ; MAZZA, 2007). Saponinas triterpênicas glicosídicas apresentam ação antifúngica intimamente influenciada pela presença de ligantes na porção C-3 e C-28. Estudos realizados por Saha et al., (2010) determinaram a relação estrutura-atividade de ácidos protobassicos glicosilados de *Diploknema butyracea* (Sapotaceae) na atividade fungicida. Esses estudos mostraram que a remoção de açúcares em C-3 diminui drasticamente essa atividade e também comprovaram que a presença da cadeia oligossacarídica em C-28 é um pré-requisito fundamental para a atividade antifúngica desses compostos.

Ríos e Recio (2005) comentaram que a atividade inferior de compostos isolados quando comparada ao extrato ou fração de origem confirmam as propriedades medicinais da planta utilizada. Em nosso estudo a ação do extrato bruto e das frações de *M. commersonii* foi superior à atividade dos compostos isolados frente à *C. albicans*, o que pode ser uma ocorrência de grande importância devido à maior facilidade na obtenção e rendimento superior de extratos e frações, quando comparados aos compostos isolados, tendo em vista o desenvolvimento de fitoterápicos empregados no combate a essas infecções.

7. Conclusão

A avaliação da composição química do EEMc resultou na determinação estrutural de um norisoprenoide (**1'**) e quatro saponinas triterpênicas glicosídicas de alto peso molecular (**2'**, **3'**, **4'** e **5'**) presentes na FMaPMc. Os compostos β e α -amirinas (**6'** e **7'**), seus acetatos (**8'** e **9'**), os acetatos de lupeol (**10'**) e de cicloartenol-24 metileno foram identificações na FMePMc.

As atividades anti-helmíntica, antibacteriana e antifúngica de extratos, frações e compostos isolados de folhas de *M. commersonii* também foram estudados. A F₂ oriunda da FMaPMc contendo flavonoides em sua composição apresentou a melhor atividade anti-helmíntica dentre as amostras testadas, o composto **4'** foi ativo na maior concentração em 72 horas de exposição. O EEMc e a FMaPMc apresentaram efetiva ação frente à *C. albicans* e *S. aureus*. A FMePMc

que contém triterpenos pentacíclicos apresentou ação antifúngica promissora. Dentre saponinas protobassicas isoladas, **3'** e **5'** apresentaram potente atividade antimicrobiana. O mecanismo de ação das saponinas frente aos microrganismos não está totalmente elucidado, no entanto a presença da cadeia oligossacarídica (C-28) tem importância fundamental nessa ação. Os compostos **1'**, **2'**, **3'**, **4'** e **5'** foram isolados pela primeira vez do extrato etanólico das folhas de *M. commersonii*.

Este estudo forneceu bases científicas consistentes sobre a composição química das folhas de *Mimusops commersonii* e o papel desempenhado por esses compostos frente aos patógenos testados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo realizado com extratos, frações e compostos isolados das folhas de sapoti e abricó-da-praia resultou na identificação de compostos presentes nas frações de maior e menor polaridade de ambas as espécies.

Considerando a espécie *Manilkara zapota* o extrato etanólico e a fração de maior polaridade (FMaPMz) apresentaram ação anti-helmíntica promissora relacionada à presença de ácido clorogênico e flavonoides de núcleo miricetina em sua composição. Esses compostos foram identificados por métodos cromatográficos e espectrométricos e suas estruturas químicas foram elucidadas por técnicas espectroscópicas. Compostos triterpênicos pentacíclicos foram identificados na fração de menor polaridade (FMePMz), que apresentou potente atividade antimicrobiana.

Um norisoprenoide glicosídico e quatro saponinas (ácidos 3-glicopiranosilprotobassicos) foram isolados da fração de maior polaridade de *Mimusops commersonii* e suas estruturas foram elucidadas por meio de técnicas espectroscópicas. A avaliação biológica da espécie mostrou que o extrato etanólico apresentou potencial atividade antimicrobiana e a fração enriquecida em flavonoides (F₂) foi ativa frente ao *Strongyloides venezuelensis*. As saponinas **3'** e **5'** apresentaram atividade antimicrobiana pronunciada, já a saponina **4'** apresentou atividade anti-helmíntica. Compostos triterpênicos foram identificados na fração de menor polaridade que por sua vez, apresentou ação antifúngica e antibacteriana potentes.

O estudo bioguiado das espécies *M. zapota* e *M. commersonii* revelou similaridades quanto à composição química das duas espécies pertencentes à família Sapotaceae, com destaque para: flavonoides, majoritários em *M. zapota*; saponinas, predominantes em *M. commersonii* e compostos triterpênicos pentacíclicos com abundâncias relativas semelhantes em ambas as espécies. Em adição, a avaliação biológica comprovou que a magnitude das ações anti-helmíntica e antimicrobiana dos extratos e frações frente aos patógenos testados está diretamente relacionada à presença das classes de compostos identificadas.

REFERÊNCIAS

ABU OSMAN, M. et al. Antimicrobial Investigation on Manilkara zapota (L.) P. Royen. **International Journal of Drug Development and Research**, v. 3, n. 1, p. 185–190, 2011.

ADEMOLA, I. O.; FAGBEMI, B. O.; IDOWU, S. O. Anthelmintic activity of extracts of Spondias mombin against gastrointestinal nematodes of sheep: Studies in vitro and in vivo. **Tropical Animal Health and Production**, v. 37, n. 3, p. 223–235, 2005.

AHMED, R. et al. Saponins from the seeds of Achras sapota. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 10, n. 1, p. 7–16, 2008.

ALI, M.; BHUTANI, K. K.; SRIVASTAVA, T. N. Triterpenoids from symplocos racemosa Bark. **Phytochemistry**, v. 29, n. 11, p. 1–4, 1990.

AROT, L. O. M.; MIDIWO, J. O.; KRAUST, W. A flavonol glycoside from Myrsine africana leaves. **Phytochemistry**, v. 43, n. 5, p. 1107–1109, 1996.

AYERS, S. et al. Flavones from Struthiola argentea with anthelmintic activity in vitro. **Phytochemistry**, v. 69, n. 2, p. 541–545, 2008.

BALIGA, M. S. et al. Chemistry and medicinal properties of the Bakul (Mimusops elengi Linn): A review. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1823–1829, 2011.

BASTOS, L. A. D. **Efeito anti-helmíntico dos extratos etanólicos das folhas de diferentes espécies de árvores frutíferas sobre Strongyloides venezuelensis in vitro. Campinas (2011).** [s.l.] Programa de Pós-graduação e em Biologia Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, Campinas São Paulo, 2011.

BEKNAZAROVA, M.; WHILEY, H.; ROSS, K. Strongyloidiasis: A disease of socioeconomic disadvantage. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 5, 2016.

BISOFFI, Z. et al. Strongyloides stercoralis: A Plea for Action. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 5, p. 7–10, 2013.

BOONMARS, T. et al. In vitro antiparasitic activity of extracts of *Cardiospermum halicacabum* against third-stage larvae of *Strongyloides stercoralis*. **Parasitology Research**, v. 97, n. 5, p. 417–419, 2005.

BOONYUEN, C. et al. Antioxidant Capacity and Phenolic Content of *Mimusops elengi* Fruit Extract. **Kasetsart Journal : Natural Science**, v. 27, p. 21–27, 2009.

BRACA, A. et al. Chemical composition and antioxidant activity of phenolic compounds from wild and cultivated *Sclerocarya birrea*(Anacardiaceae) leaves. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, p. 6689–6695, 2003.

BUDZIKIEWICZ, H.; WILSON, M.; DJERASSI, C. Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems. XXXII.' Pentacyclic Triterpenes. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 85, n. 22, p. 3688–3699, 1963.

BURG, R. W. et al. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: Isolation and chromatographic properties. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 15, n. 3, p. 368–371, 1979.

CARSON, C. F. et al. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 1914–1920, 2002.

CARVALHO, C. O. et al. The anthelmintic effect of plant extracts on *Haemonchus contortus* and *Strongyloides venezuelensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 183, n. 3–4, p. 260–268, 2012.

CASTILLO-MUÑOZ, N. et al. Flavonol 3-O-glycosides series of *Vitis vinifera* Cv. Petit Verdot red wine grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 1, p. 209–219, 14 jan. 2009.

CHANDA, S. V; NAGANI, K. V. Antioxidant Capacity of *Manilkara zapota* L . Leaves Extracts Evaluated by Four in vitro Methods. **Nature and Science**, v. 8, n. 10, p. 260–266, 2010.

CHEN, H. Y. et al. Cytotoxic protobassic acid glycosides from *Planchonella obovata*

leaf. **Phytochemistry Letters**, v. 11, p. 229–235, 2015.

CHIN, Y. W. et al. Drug delivery from natural sources. **Journal of American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 8, p. E239-253, 2006.

CLSI. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard— Second Edition**. Wayne, PA Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008: [s.n.].

CLSI. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard - Third edition**. Wayne, PA, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008: [s.n.].

CLSI. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard eighth Edition**. Eighth edi ed. Wayne, PA Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009: [s.n.]. v. 29

CONSTANZO, C. D. G. et al. Isolation of flavonoids from *Anemopaegma arvense* (Vell) Stellf . ex de Souza and their antifungal activity against *Trichophyton rubrum*. **Braz J Pharm Sci**, v. 49, n. 3, p. 559–565, 2013.

COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 4, p. 564–582, 1999.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1830, p. 3670–3695, 2013.

CRUZ, M. C. S. et al. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 409–412, 2007.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, n. 5, p. 343–356, 2005.

DA CUNHA, M. G. et al. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. **BMC Complement Altern Med**, v. 13, p. 23, 2013.

DE CARVALHO, E. F. G. et al. Immunoblotting using *Strongyloides venezuelensis* larvae, parthenogenetic females or eggs extracts for the diagnosis of experimentally infected immunosuppressed rats. **Experimental Parasitology**, v. 157, p. 117–123, 2015.

DE OLIVEIRA, E. C. et al. Inhibitory effect of plant *Manilkara subsericea* against biological activities of *Lachesis muta* snake venom. **BioMed Research International**, 2014.

DELLATORRE, A. **Óleo essencial de *Baccharis trimera* (less.) Dc.: estudo fitoquímico e avaliação in vitro das atividades antiproliferativa e mutagênica.** [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2013.

DENNY, C. et al. Antiproliferative properties of polyketides isolated from *Virola sebifera* leaves. **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 1, p. 127–130, jan. 2008.

DESRIVOT, J. et al. Antiparasitic activity of some New Caledonian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 1, p. 7–12, 2007.

EGERTON, J. R. et al. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: Efficacy of the B 1(a) component. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 15, n. 3, p. 372–378, 1979.

ELIAS, V. O. et al. Mass spectra of triterpenyl alkanoates, novel natural products. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 32, n. 12, p. 1356–1361, 1997.

ESKANDER, J. et al. Saponins from the leaves of *Mimusops laurifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 6, p. 832–842, 2005.

ESKANDER, J. et al. Saponins from the seeds of *Mimusops laurifolia*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 16, p. 1793–1799, 2006.

FAYEK, N. et al. Chemical and biological study of *Manilkara zapota* (L.) Van Royen leaves (Sapotaceae) cultivated in Egypt. **Pharmacognosy Research**, v. 4, n. 2, p. 85, 2012.

FAYEK, N. M. et al. New triterpenoid acyl derivatives and biological study of

Manilkara zapota (L .) Van Royen fruits . **Pharmacognosy Res.**, v. 5, n. 2, p. 55–59, 2013.

FERNANDES, C. P. et al. Triterpene esters and biological activities from edible fruits of manilkara subsericea (Mart.) dubard, sapotaceae. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

FITZPATRICK, C. et al. Benchmarking the Cost per Person of Mass Treatment for Selected Neglected Tropical Diseases: An Approach Based on Literature Review and Meta-regression with Web-Based Software Application. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 12, p. e0005037, 2016.

FORRER, A. et al. Ivermectin Treatment and Sanitation Effectively Reduce Strongyloides stercoralis Infection Risk in Rural Communities in Cambodia. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 8, p. e0004909, 2016.

FOSSSEN, T. et al. Flavonoids from blue flowers of Nymphaea caerulea. **Phytochemistry**, v. 51, n. 8, p. 1133–1137, ago. 1999.

FOUQUÉ, A. Espèces fruitières d’Amerique Tropicale: famille des Sapotacées. **Fruits**, v. 27, n. 9, p. 632–643, 1972.

GONÇALVES, A. L. R. et al. A new faecal antigen detection system for Strongyloides venezuelensis diagnosis in immunosuppressed rats. **Experimental Parasitology**, v. 125, n. 4, p. 338–341, 2010.

GONÇALVES, A. L. R. et al. Antigen, antibody and immune complex detection in serum samples from rats experimentally infected with Strongyloides venezuelensis. **Experimental Parasitology**, v. 130, n. 3, p. 205–208, 2012.

GONÇALVES, A. L. R. et al. Specific IgG and immune complex responses to parthenogenetic females and eggs of nematode Strongyloides venezuelensis for the diagnosis of immunosuppression in infected rats. **Journal of Helminthology**, v. 90, n. 3, 2016.

GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAĞ, Ö.; MAZZA, G. Saponins: Properties, Applications and Processing. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, n. 3, p. 231–

258, 29 mar. 2007.

HAMILTON, G.; BASKET, T. In the arms of Morpheus: the development of morphine for postoperative pain relief. **Can. J. Anesth.**, v. 47, p. 367–374, 2000.

HARBORNE, J. B. Comparative biochemistry of the flavonoids. IV. Correlations between chemistry, pollen morphology and systematics in the family Plumbaginaceae. **Phytochem.**, v. 6, n. 1966, p. 1415–1428, 1967.

HART, N. K.; LAMBERTON, J. A.; TRIFFETT, A. C. K. Triterpenoids of *Achras sapota* (Sapotaceae). **Australian Journal of Chemistry**, v. 26, n. 8, p. 1827–1829, 1973.

HARTMANN, T. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2831–2846, 2007.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027–1031, 2002.

HOTEZ, P. J. et al. Control of Neglected Tropical Diseases. **The New England Journal of Medicine**, p. 1018–1027, 2007.

HOTEZ, P. J. et al. The Global Burden of Disease Study 2010: Interpretation and Implications for the Neglected Tropical Diseases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, p. 1–9, 2014.

HOUWELING, T. A. J. et al. Socioeconomic Inequalities in Neglected Tropical Diseases: A Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 5, p. 1–29, 2016.

ISLAM, M. R. et al. Antibacterial and phytochemical screening of ethanol extracts of *Manilkara zapota* leaves and bark. **International Journal of Pharma Sciences**, v. 3, n. 6, p. 394–397, 2013.

ISMAIL, K. A. et al. Comparison between the effect of *Lawsonia inermis* and flubendazole on *Strongyloides* species using scanning electron microscopy. **Journal**

of Parasitic Diseases, v. 40, n. 2, p. 415–422, 2016.

ITO, A. et al. A sterol with an unusual side chain from *Anoectochilus koshunensis*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 6, p. 1465–1467, 1994.

JAIN, P. K. et al. Evaluation of Analgesic Activity of *Manilkara Zapota* (Leaves). **European Journal of Experimental Biology**, v. 1, n. 1, p. 14–17, 2011.

JANA, G.; DHANAMJAYARAO, M.; VANI, M. Evaluation of anthelmintic potential of *Mimusops elengi* linn. (Sapotaceae) leaf. **J Pharm Res**, v. 3, n. 10, p. 2514-2515, 2010.

JESSEN, P. et al. Occupational irritant contact dermatitis in a carpenter. **Contact Dermatitis**, v. 60, n. 4, p. 240–241, 2009.

JIANG, Y. et al. Triterpenoid saponins from the root of *Sideroxylon cubense*. **Phytochemistry**, v. 35, n. 4, p. 1013–1015, 1994.

JUNG, M. et al. Flavonoids from *Symplocos racemosa*. **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 358–365, 2015.

KADAM, P. V et al. *Mimusops elengi* : A Review on Ethnobotany , Phytochemical and Pharmacological Profile. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 1, n. 3, p. 64–74, 2012.

KANERIA, M. et al. Determination of Antibacterial and Antioxidant Potential of Some Medicinal Plants from Saurashtra Region, India. **Indian journal of pharmaceutical sciences**, v. 71, n. 4, p. 406–412, 2009.

KANLAYAVATTANAKUL, M.; LOURITH, N. Sapodilla seed coat as a multifunctional ingredient for cosmetic applications. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 11, p. 2215–2218, 2011.

KERBOEUF, D.; RIOU, M.; GUEGNARD, F. Flavonoids and Related Compounds in Parasitic Disease Control. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 2, p. 116–128, 2008.

KHOURY, M. **Préparation , analyse et activités antimicrobiennes d ' huiles essentielles de plantes Libanaises**. [s.l.] Museum National d'Histoire Naturelle, Paris, 2015.

KROLEWIECKI, A. J. et al. A Public Health Response against Strongyloides stercoralis: Time to Look at Soil-Transmitted Helminthiasis in Full. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 5, p. 1–8, 2013.

KUMAR, H. A. K. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of Mimosa elengi seed extract mediated isotropic silver nanoparticles. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 130, p. 13–18, 2014.

LAVAUD, C. et al. Saponins from three species of Mimosa. **Phytochemistry**, v. 41, n. 3, p. 887–893, 1996.

LAWRIE, W.; MCLEAN, J.; OLUBAJO, O. O. O. Triterpenes from balata resin. **Phytochemistry**, v. 9, n. 1905, p. 1669–1670, 1970.

LINDOSO, J. A. L.; LINDOSO, A. A. B. P. Neglected tropical diseases in Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 51, n. 5, p. 247–253, 2009.

LITTLETON, J., ROGERS, T., FALCONE, D. Novel approaches to plant drug discovery based on high throughput pharmacological screening and genetic manipulation. **Life Sciences**, v. 78, p. 467–475, 2005.

LOHÉZIC-LE DÉVÉHAT, F. et al. Traditional Medicinal Plants of Brunei Darussalam Part III. Sengkurong. **Pharmaceutical Biology**, v. 30, n. 4, p. 378–383, 1992.

LUSTIGMAN, S. et al. A research agenda for helminth diseases of humans: The problem of helminthiasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 4, 2012.

LYDDIARD, J. R. A.; WHITFIELD, P. J.; BARTLETT, A. Antischistosomal bioactivity of isoflavonoids from Millettia thonningii (Leguminosae). **The Journal of parasitology**, v. 88, n. 1, p. 163–170, 2002.

MA, J. et al. Bioactive novel polyphenols from the fruit of Manilkara zapota (Sapodilla). **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 7, p. 983–986, 2003.

MAHMOUD, I. I. et al. Acylated flavonol glycosides from *Eugenia jambolana* leaves. **Phytochemistry**, v. 58, n. 8, p. 1239–1244, 2001.

MAMDOUH, N. S. et al. Taxiphyllin 6' - O -Gallate , Actinidioionoside 6' - O -Gallate and Myricetrin 2'' - O -Sulfate from the Leaves of *Syzygium samarangense* and Their Biological Activities. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 62, n. October, p. 1013–1018, 2014.

MARUYAMA, H. et al. Successive changes in tissue migration capacity of developing larvae of an intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis*. **Parasitology**, v. 132, n. May 2009, p. 411–418, 2006.

MASSIOT, G. et al. Saponins from *Tridesmostemon claessenssi*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 10, p. 3291–3298, 1990.

MATSUNAMI, K. et al. Absolute configuration of (+)-pinoresinol 4-O-[6''-O-galloyl]-B-d-glucopyranoside, macarangiosides E, and F isolated from the leaves of *Macaranga tanarius*. **Phytochemistry**, v. 70, n. 10, p. 1277–1285, 2009.

MCKERROW, J. H. Recognition of the role of Natural Products as drugs to treat neglected tropical diseases by the 2015 Nobel prize in physiology or medicine. **Natural product reports**, v. 32, n. 12, p. 1610–1611, 2015.

MISHRA, B.B., TIWARI, V. K. Natural product: an evolving role in future drug discovery. **Eur. J. Med. Chem**, v. 46, p. 4769–4807, 2011.

MISRA, G.; NIGAM, S. K.; MITRA, C. R. Constituents of *Mimusops manilkara* leaves and saponins of *Mimusops* seed kernels. **Phytochemistry**, v. 8, n. 11, p. 2255–2256, nov. 1969.

MISRA, G.; NIGAM, S. K.; MITRA, C. R. Triterpenoids of *mimusops manilkara* trunk bark. **Phytochemistry**, v. 9, n. 9, p. 2067–2068, set. 1970.

MISRA, S.; NIGAM, S. K.; MITRA, C. R. Studies on *Mimusops* spp. **Planta Medica**, v. 26, p. 155–165, 1974.

MOLYNEUX, D. H.; MALECELA, M. N. Neglected tropical diseases and the Millennium Development Goals - why the “other diseases” matter: reality versus

rhetoric. **Parasit Vectors**, v. 4, p. 234, 2011.

MONKS, A. et al. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 83, n. 11, p. 757–766, 1991.

MONTES, M.; SAWHNEY, C.; BARROS, N. Strongyloides stercoralis: there but not seen. **Current opinion in infectious diseases**, v. 23, n. 5, p. 500–4, 2010.

MORAIS, P. L. D. et al. Cell wall biochemistry of sapodilla (Manilkara zapota) submitted to 1-methylcyclopropene. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 20, n. 2, p. 85–94, 2008.

NAGANI, K.; KANERIA, M.; CHANDA, S. Pharmacognostic studies on the leaves of Manilkara zapota L. (Sapotaceae). **Pharmacognosy Journal**, v. 4, n. 27, p. 38–41, 2012.

NAIR, R.; CHANDA, S. Antimicrobial Activity of Terminalia catappa, Manilkara zapota and Piper betel Leaf Extract. **Indian journal of pharmaceutical sciences**, v. 70, n. 3, p. 390–393, 2008.

NDHLALA, A. R. et al. Antimicrobial , Anthelmintic Activities and Characterisation of Functional Phenolic Acids of Achyranthes aspera Linn .: A Medicinal Plant Used for the Treatment of Wounds and Ringworm in East Africa. **Frontiers in pharmacology**, v. 6, n. November, p. 1–8, 2015.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

NODEN, B. H.; VAN DER COLF, B. E. Neglected tropical diseases of Namibia: Unsolved mysteries. **Acta Tropica**, v. 125, n. 1, p. 1–17, 2013.

OGUNKOYA, L. Application of mass spectrometry in structural problems in triterpenes. **Phytochemistry**, v. 20, n. 1, p. 121–126, 1981.

OKEKE, I. N. et al. Antimicrobial resistance in developing countries. Part I: recent trends and current status. **The Lancet infectious diseases**, v. 5, n. August, p. 481–

493, 2005.

OLSEN, A. et al. Strongyloidiasis - the most neglected of the neglected tropical diseases? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 10, p. 967–972, 2009.

OTARI, S. V. et al. Green phytosynthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of *Manilkara zapota* (L.) seeds and its inhibitory action against *Candida* species. **Materials Letters**, v. 116, p. 367–369, 2014.

OYO-ITA, O. E. et al. Occurrence and Sources of Triterpenoid Methyl Ethers and Acetates in Sediments of the Cross-River System , Southeast Nigeria. **Int J Anal Chem**, p. 1–8, 2010.

PABST, A. et al. Two diastereomeric 3-oxo- α - ionol- β -D- glucosides from raspeberry fruit. **Phytochemistry**, v. 31, n. 5, p. 1649–1652, 1992.

PAULA, F. M.; COSTA-CRUZ, J. M. Epidemiological aspects of strongyloidiasis in Brazil. **Parasitology**, p. 1–10, 2011.

PENNINGTON, T. D. **The Genera of Zapotaceae**. Disponível em: <<http://www.kew.org/>>. Acesso em: 12 ago. 2015.

PENNINGTON, T. D.; J. SARUKHA'N. **Árboles tropicales de México**. 2nd. ed. Ciudad de Mexico: Universidad Nacional Autónoma de México y Fondo de Cultura Econômica, 1998.

POTTERAT, O. Natural products in drug discovery – concepts and approaches for tracking bioactivity. **Current Organic Chemistry**, v. 10, p. 899–920, 2006.

PUTHIYAKUNNON, S. et al. Strongyloidiasis—An Insight into Its Global Prevalence and Management. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 8, 2014.

QUATTROCCHI, U. **CRC World Dictionary of Plant Names: Common Names, Scientific Names, Eponyms, Synonyms, and Etymology**. Boca Raton, London, New York, Washington,: CRC Press, 2000.

RADULOVIC, N.; BLAGOJEVIC, P.; PALIC, R. Comparative study of the leaf volatiles of *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. and *Vaccinium vitis-idaea* L. (Ericaceae). **Molecules**, v. 15, n. 9, p. 6168–6185, 2010.

RADULOVIĆ, N. S. et al. Antimicrobial plant metabolites: structural diversity and mechanism of action. **Current medicinal chemistry**, v. 20, n. 7, p. 932–52, 2013.

RAJAKUMAR, G.; RAHUMAN, A. A. Acaricidal activity of aqueous extract and synthesized silver nanoparticles from *Manilkara zapota* against *Rhipicephalus* (Boophilus) microplus. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 1, p. 303–309, 2012.

RANGAMA, B. N. L. D. et al. Antimicrobial activity of *Tephrosia purpurea* (Linn.) Pers. and *Mimusops elengi* (Linn.) against some clinical bacterial isolates. **J.Natn.Sci.Foundation Sri Lanka**, v. 37, n. June, p. 139–145, 2009.

REDDY, M. et al. Oral drug therapy for multiple neglected tropical diseases: a systematic review. **J. Amer. med. Ass.**, v. 298, p. 1911–1924, 2007.

REGASINI, L. O. et al. Constituintes químicos das flores de *Pterogyne nitens* (Caesalpinioideae). **Quimica Nova**, v. 31, n. 4, p. 802–806, 2008.

RELX INTELLECTUAL PROPERTIES SA. **Reaxys**. Disponível em: <<https://www.reaxys.com.chimie.gate.inist.fr/reaxys/secured/search.do>>.

REN, G. et al. Synthesis of flavonol 3-O-glycoside by UGT78D1. **Glycoconjugate Journal**, v. 29, n. 5–6, p. 425–432, 2012.

RENSLO, A. R.; MCKERROW, J. H. Drug discovery and development for neglected parasitic diseases. **Nature Chem Biol**, v. 2, p. 701–710, 2006.

RHOURLI-FRIH, B. et al. Pentacyclic triterpenes from *Manilkara bidentata* resin. Isolation, identification and biological properties. **Fitoterapia**, v. 88, p. 101–108, 2013.

RÍOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1–2, p. 80–84, 2005.

RUGAI, E., MATTOS, T., BRISOLA, A. P. Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes: modificação do método de Baermann. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 14, p. 1–8, 1954.

SAHA, S. et al. Structure-biological activity relationships in triterpenic saponins: the relative activity of protobassic acid and its derivatives against plant pathogenic fungi. **Pest Management Science**, v. 66, n. 8, p. 825–831, 2010.

SAHU, N. P. et al. Novel triterpenoid saponins from *Mimusops elengi*. **Tetrahedron**, v. 51, n. 48, p. 13435–13446, nov. 1995.

SAMUELSSON, G. **Drugs of Natural Origin: a Textbook of Pharmacognosy**. 5th. ed. Stockholm.: Swedish Pharmaceutical Press, 2004.

SAMY, M. N. et al. One new flavonoid xyloside and one new natural triterpene rhamnoside from the leaves of *Syzygium grande*. **Phytochemistry Letters**, v. 10, n. 1, p. 86–90, 2014.

SANTOS, P. E. R. DOS. **Estudo da composição química e avaliação da atividade esquistossomocida do extrato etanólico e frações das folhas de *Phyllanthus amarus* Schum and Thonn (Euphorbiaceae)**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2013.

SAQER, A. S. et al. Optimum methods of inactivation of *Strongyloides stercoralis* larvae from reclaimed wastewater. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 130, n. 1–3, p. 341–346, 2007.

SAROJINI, N. et al. Correlation between the phytochemical constituents and anthelmintic activity of *Lawsonia inermis* leaf extracts. **International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy**, v. 3, n. 4, p. 559–562, 2012.

SATO, Y. et al. In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 403, n. 1–2, p. 136–138, 2011.

SCHÄR, F. et al. *Strongyloides stercoralis*: Global Distribution and Risk Factors. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 7, p. 1–18, 2013.

SCHARBERT, S.; HOLZMANN, N.; HOFMANN, T. Identification of the astringent taste compounds in black tea infusions by combining instrumental analysis and human bioresponse. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 11, p. 3498–3508, 2004.

SCHERRER, A. U. et al. Sequential analysis of helminth egg output in human stool samples following albendazole and praziquantel administration. **Acta Tropica**, v. 109, n. 3, p. 226–231, 2009.

SCHLICKMANN, F. et al. Gastroprotective bio-guiding study of fruits from *Mimusops balata*. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 388, n. 11, p. 1187–1200, 2015.

SEIDEL, V.; BAILLEUL, F.; WATERMAN, P. G. (Rel)-1B,2A-di-(2,4-dihydroxy-6-methoxybenzoyl)-3B,4A-di-(4-methoxyphenyl)-cyclobutane and other flavonoids from the aerial parts of *Goniiothalamus gardneri* and *Goniiothalamus thwaitesii*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 5, p. 439–446, 2000.

SHAHWAR, D.; RAZA, M. A. Antioxidant potential of phenolic extracts of *Mimusops elengi*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 7, p. 547–550, 2012.

SHEN, C.-J.; CHEN, C.-K.; LEE, S.-S. Polar Constituents from *Sageretia Thea* Leaf Characterized by HPLC-SPE-NMR Assisted Approaches. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 56, n. 5, p. 1002–1009, 2009.

SHOEMAKER, R. H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. **Nature Reviews**, v. 6, p. 813–823, 2006.

SHUI, G.; WONG, S. P.; LEONG, L. P. Characterization of Antioxidants and Change of Antioxidant Levels during Storage of *Manilkara zapota* L. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 7834–7841, 2004.

SHUNYAN MO, LINLIN DONG, W. J. H. AND R. B. VAN B. Quantitative analysis of phytosterols in edible oils using APCI liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **NIH Public Access**, v. 48, n. 9, p. 949–956, 2013.

SIDDIQUI, A. A. et al. Strongyloides stercoralis: identification of antigens in natural human infections from endemic areas of the United States. **Parasitology research**, v. 83, n. 7, p. 655–658, 1997.

SINGH, K. L.; SINGH, D. K.; SINGH, V. K. CHARACTERIZATION OF THE MOLLUSCICIDAL ACTIVITY OF Bauhinia variegata AND Mimosa pudica PLANT EXTRACTS AGAINST THE Fasciola VECTOR Lymnaea acuminata. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 54, n. 3, p. 135–140, 2012.

SILVA, C. A. M. **Contribuição ao estudo químico e biológico de Pouteria gardnerii (Mart. & Miq.) Baehni (Sapotaceae)**. [s.l.] Universidade de Brasília, 2007.

SILVA, C. A. M.; SIMEONI, L. A.; SILVEIRA, D. Genus Pouteria: Chemistry and biological activity Revisão. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2A, p. 501–509, 2009.

SILVAJUNIOR, J. F. et al. O sapotizeiro no Brasil. **Rev. Bras. Frutic**, v. 36, n. 1, p. 86–99, 2014.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Silverstein - Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7th. ed. [s.l.: s.n.].

SINGH, K. L. et al. Mimosa pudica Linn (Mulsari): a potential medicinal plant. **Archives of Biomedical Sciences**, v. 2, n. 1, p. 18–29, 2014.

SINGH, K. L.; SINGH, D. K.; SINGH, V. K. Characterization of the molluscicidal activity of Bauhinia variegata and Mimosa pudica plant extracts against the Fasciola vector Lymnaea acuminata. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 54, n. 3, p. 135–140, 2012.

SNOWDEN, R. et al. A Comparison of the Anti- Staphylococcus aureus Activity of Extracts from Commonly Used Medicinal Plants. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 20, n. 5, p. 375–382, 2014.

SOLECKI, R. Shanidar IV, a Neanderthal flower burial in northern Iraq. **Science**, v. 190, p. 880–881, 1975.

SUBRAMANIAN, S. S.; NAIR, A. G. R. Myricetin and myricetin-3-O-l-rhamnoside from the leaves of *Madhuca indica* and *Achras sapota*. **Phytochemistry**, v. 11, n. 10, p. 3090–3091, out. 1972.

SUNITA, M.; SAROJINI, P. *Madhuca Lonigolia* (Sapotaceae): A Review of Its Traditional Uses and Nutritional Properties. **International Journal of Humanities and Social Science Invention**, v. 2, n. 5, p. 30–36, 2013.

SWENSON, U.; ANDERBERG, A. A. Phylogeny, character evolution, and classification of Sapotaceae (Ericales). **Cladistics**, v. 21, n. 2, p. 101–130, 2005.

TAKINO, Y.; IMAGAWA, H.; YOSHIDA, H. Studies on the Flavonoids in Tea Leaves. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 26, n. 10, p. 699–704, 9 out. 1962.

TANNER, S. et al. The effects of local medicinal knowledge and hygiene on helminth infections in an Amazonian society. **Social Science and Medicine**, v. 72, n. 5, p. 701–709, 2011.

TASDEMIR, D. et al. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: *in vitro*, *in vivo*, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 50, n. 4, p. 1352–1364, 2006.

THE PLANT LIST. **Version 1.1**. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/>>. Acesso em: 13 jul. 2016.

TROPICOS.ORG. **Missouri Botanical Garden**. Disponível em: <<http://www.tropicos.org>>. Acesso em: 20 jul. 2016.

TU, Y. Y. The awarded Chinese invention: antimalarial drug qinghaosu [in Chinese]. **Rev. World Invent.**, v. 4, n. 26, p. 366–370, 1981.

TU, Y. Y. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. **Nature Medicine**, v. 17, n. 10, p. 1217–1220, 2011.

VADLAMUDI, R. S.; CHI, D. S.; KRISHNASWAMY, G. Intestinal strongyloidiasis and hyperinfection syndrome. **Clinical and molecular allergy : CMA**, v. 4, p. 8, 2006.

VERMA, N.; SHUKLA, S. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. **Journal of applied research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 2, p. 105–113, 2015.

VILEGAS, J. H. Y. et al. Further triterpenes, steroids and furocoumarins from Brazilian medicinal plants of *Dorstenia* genus (Moraceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 8, n. 5, p. 529–535, 1997.

VINEY, M. E.; LOK, J. B. **Strongyloides spp.** Disponível em: <http://www.wormbook.org/chapters/www_genomesStrongyloides/genomesStrongyloides.html>. Acesso em: 11 jan. 2017.

VLAMINCK, J. et al. Vaccination against *Strongyloides venezuelensis* with homologue antigens using new immunomodulators. **The Journal of parasitology**, v. 96, n. 3, p. 643–647, 2010.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas**. Second ed. Munich, Germany: [s.n.].

WAITE, R. C. et al. Integration of water, sanitation and hygiene for the control of neglected tropical diseases: a review of progress and the way forward. **International Health**, v. 8, n. suppl 1, p. i22–i27, 2016.

WANG, H. et al. Profiles and α -amylase inhibition activity of proanthocyanidins in unripe *Manilkara zapota* (Chiku). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 12, p. 3098–3104, 2012.

WANG, M. et al. Isolation and Structural Elucidation of Aroma Constituents Bound as Glycosides from Sage (*Salvia officinalis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 7, p. 2509–2511, 1998.

WHO. **The 10 leading causes of death in the world, 2000 and 2012**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>>. Acesso em: 9 jan. 2017.

WHO. Antimicrobial resistance. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 61, n. 3, p. 383–94, 2014.

WHO. **Disability-adjusted life year (DALY) rates.** Disponível em: <http://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/daly_rates/en/>. Acesso em: 25 set. 2016.

WHO. **Neglected tropical diseases.**

WHO. **Strongyloidiasis.** Disponível em: <http://www.who.int/intestinal_worms/epidemiology/strongyloidiasis/en/>. Acesso em: 9 jan. 2017b.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, v. 64, p. 3–19, 2003.

XU, J. G.; HU, Q. P.; LIU, Y. Antioxidant and DNA-protective activities of chlorogenic acid isomers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 46, p. 11625–11630, 2012.

YOSIOKA, I.; INADA, A.; KITAGAWA, I. Structures of genuine sapogenol protobassic acid and a prosapogenol of seed kernels of *Madhuca longifolia* L. **Tetrahedron**, v. 30, p. 707–714, 1973.

ZANON, R. B. et al. Phytoconstituents isolated from dichloromethane fraction of *Vernonia tweediana* Baker leaves. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 226–229, 2008.

ANEXOS

Anexo 1: Certificado de aprovação do Comitê de Ética em experimentação animal (alteração do título).

 UNICAMP	 CEUA/UNICAMP
--	---

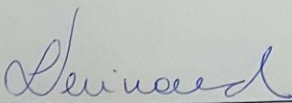
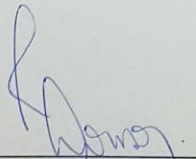
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **"Estudo fitoquímico biomonitorado de extratos de *Manilkara zapota* L. e *Labramia bojeri* A. com atividade frente ao *Strongyloides venezuelensis* a partir de modelo biológico em *Rattus norvegicus*"**, protocolo nº **4089-1**, sob a responsabilidade de **Dra. Vera Lucia Garcia / Layany Carolynny da Silva Mourão**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica ou ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais e do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal - CONCEA**, e foi aprovado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em **17 de dezembro de 2015**.

Vigência do projeto: 01/2016-03/2016
Espécie/Linhagem: Rato heterogênico / Wistar
No. de animais: 07
Idade/Peso: 30 dias / 80g
Sexo: machos
Origem: CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio**.

Campinas, 17 de dezembro de 2015.

 _____ Prof. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud Presidente	 _____ Fátima Alonso Secretária Executiva
---	--

Anexo 2: Certificado de aprovação do Comitê de Ética em experimentação animal
(alteração do título)

 UNICAMP	 CEUA/Unicamp
--	---

**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp**

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **Estudo fitoquímico biomonitorado de extratos de Manilkara zapota L. e Labramia bojeri A. com atividade frente ao Strongyloides venezuelensis a partir de modelo biológico em Rattus norvegicus** (protocolo CEUA/UNICAMP nº **4089-1**), de responsabilidade da **Profa. Dra. Vera Lucia Garcia / Layany Carolynny da Silva Mourão**, teve seu título alterado para **Abordagem fitoquímica e avaliação da atividade biológica in vitro das espécies Manilkara zapota (L.) van Royen e Mimusops commersonii (G.Don) Engl.**

Este documento é válido apenas se apresentado junto com o certificado emitido originalmente pela CEUA/UNICAMP em 17/12/2015.

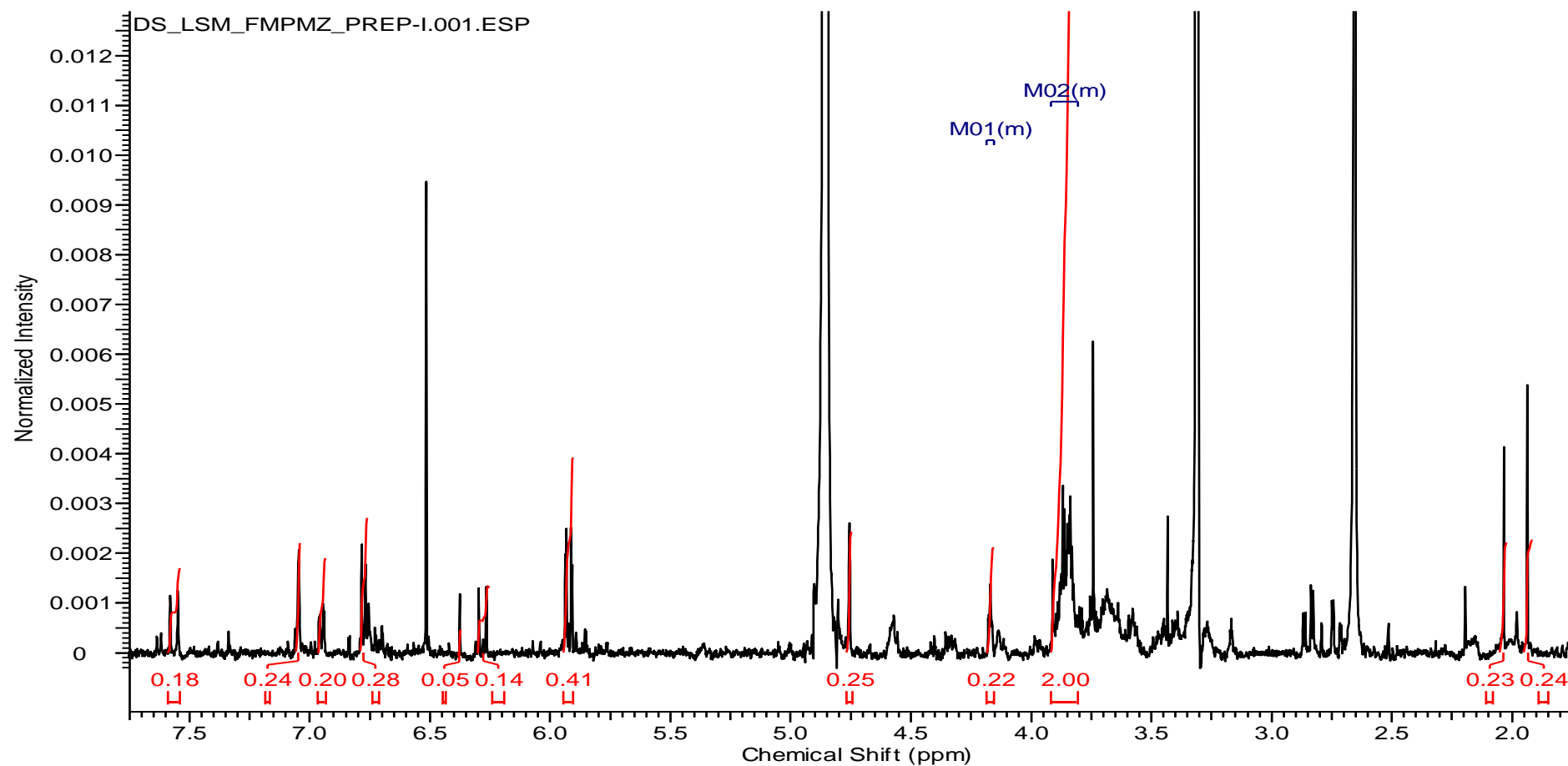
Campinas, 21 de março de 2016.

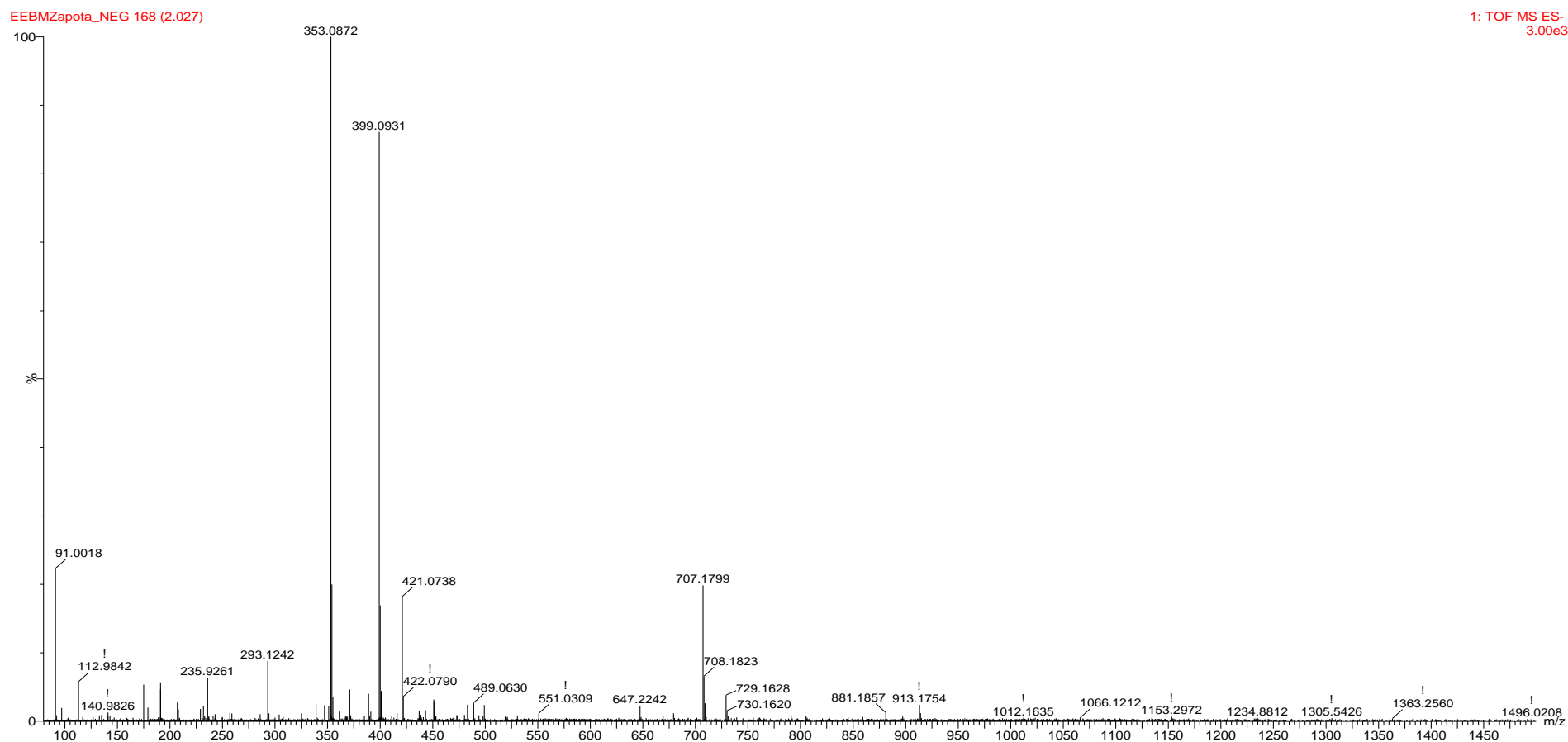
 _____ Profa. Dra. Liana M. C. Verinaud Presidente	 _____ Fátima Alonso Secretária Executiva
--	--

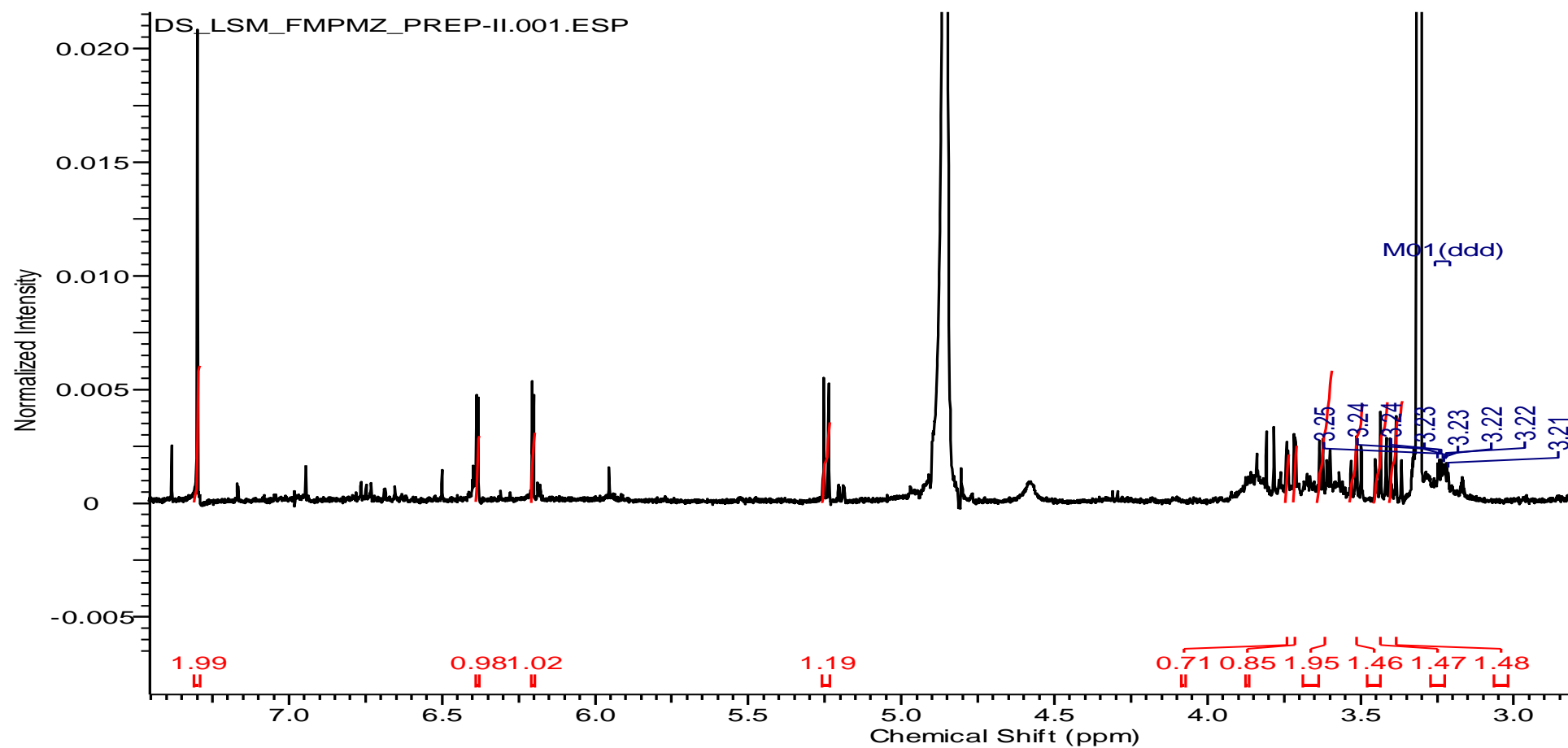
CEUA/UNICAMP Caixa Postal 6109 13083-970 Campinas, SP – Brasil	Telefone: (19) 3521-6359 E-mail: comisib@unicamp.br http://www.ib.unicamp.br/ceea/
--	---

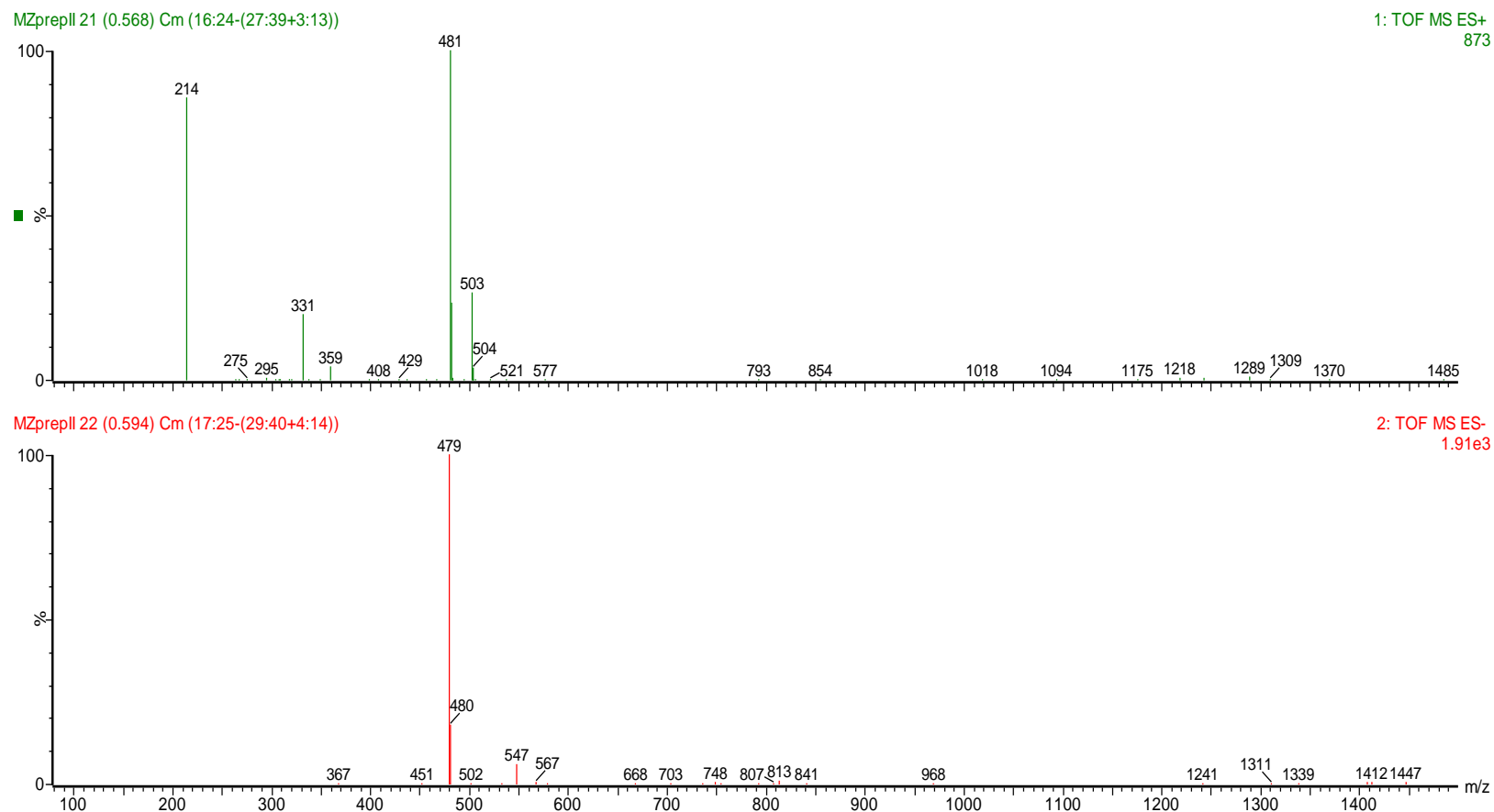
Anexos correspondentes às análises realizadas com a espécie *Manikara zapota*.

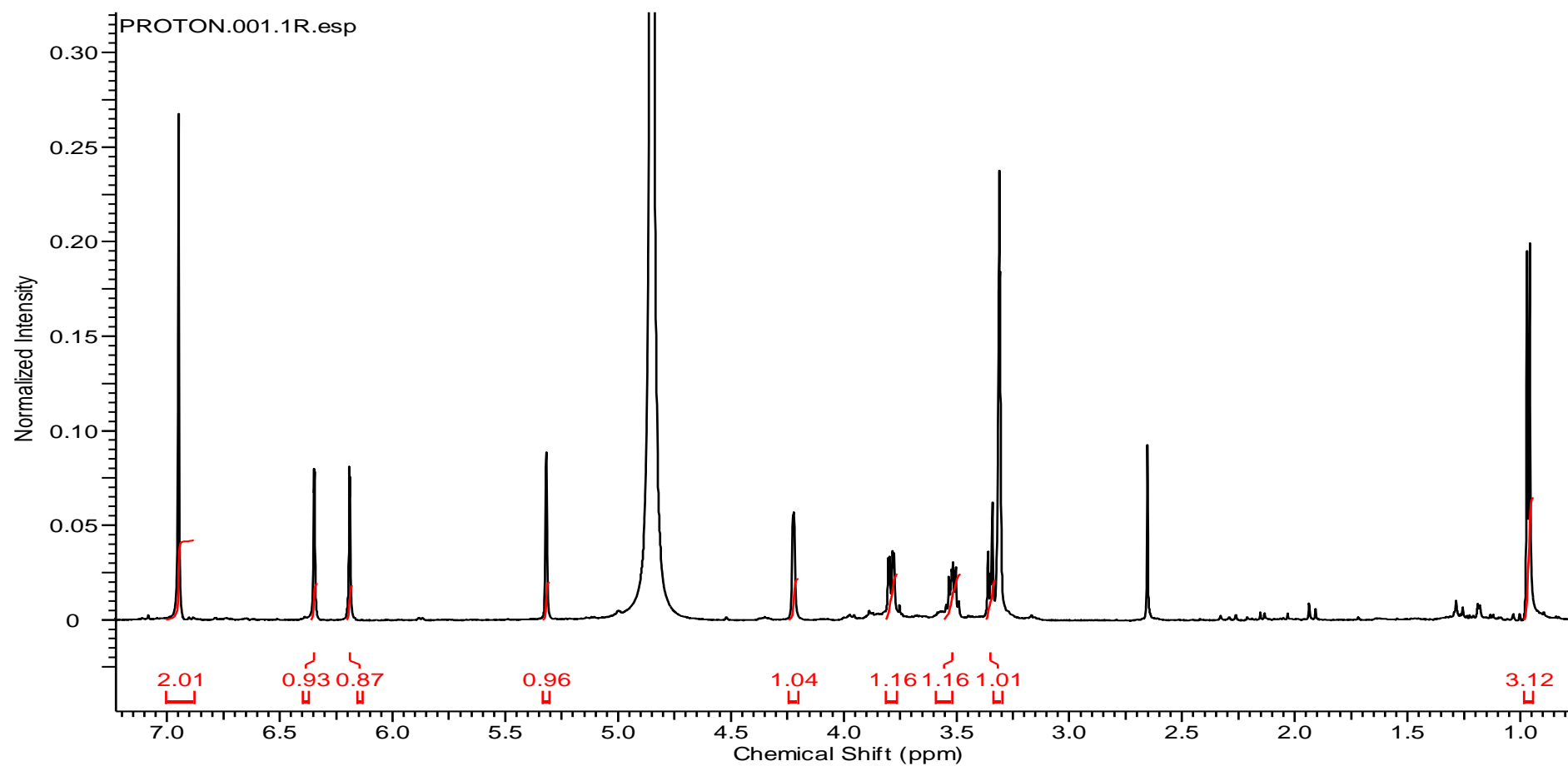
Anexo 3 Espectro expandido de RMN ^1H (500 MHz, CD_3CD) do composto 1.



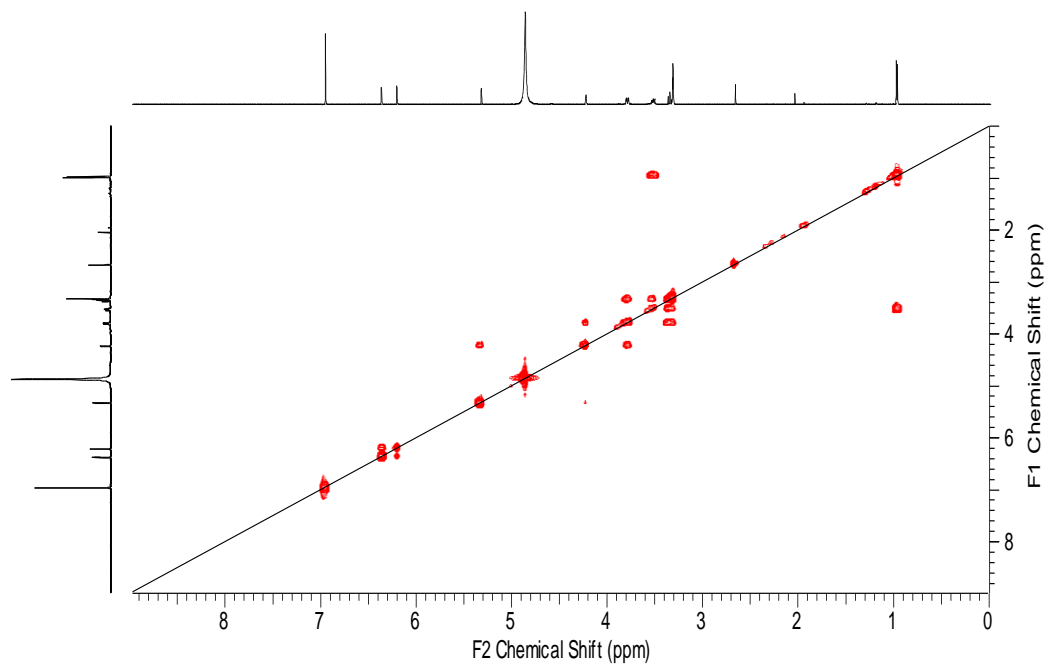
Anexo 4: Fragmentograma de HRESITOFMS correspondente ao modo negativo para o composto **1**.

Anexo 5: Espectro expandido de RMN ^1H (500 MHz, CD_3CD) do composto **2**.

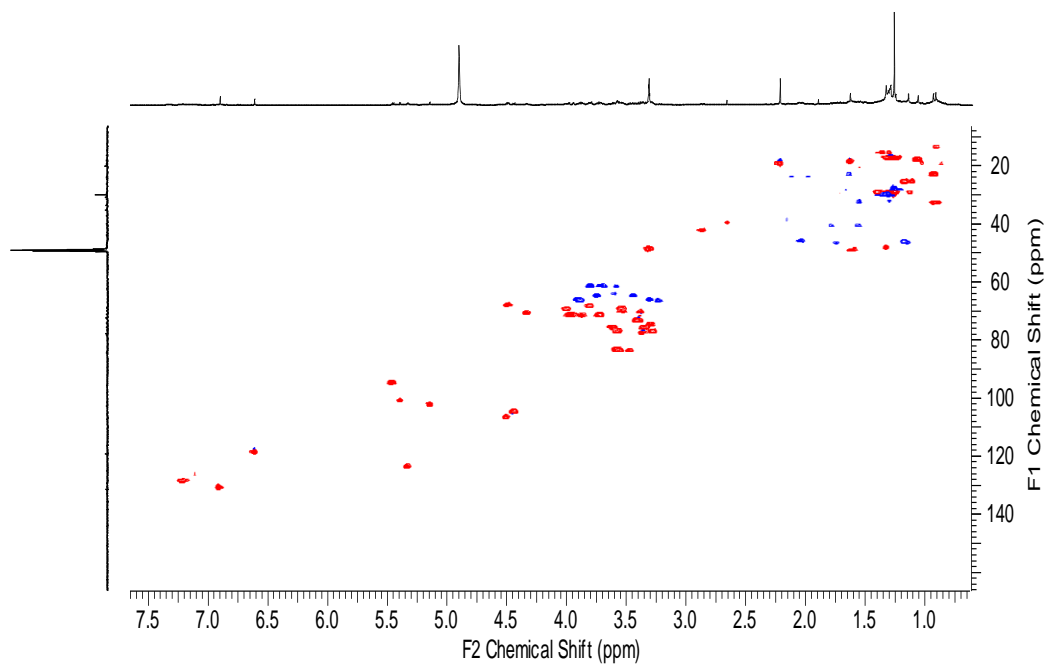
Anexo 6: Fragmentograma de HRESITOFMS em modo positivo e negativo correspondente ao composto **2**.

Anexo 7 Espectro expandido de RMN ^1H (500 MHz, CD_3CD) do composto **3**.

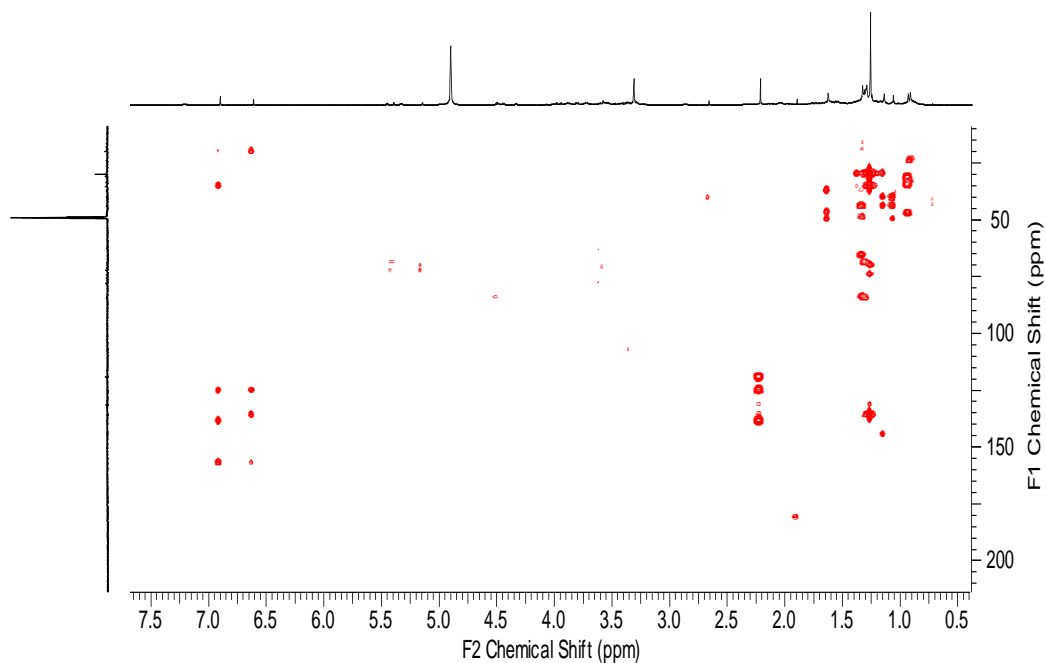
Anexo 8: Espectro expandido de RMN ^1H - ^1H COSY (500 MHz, CD_3CD) do composto **3**.



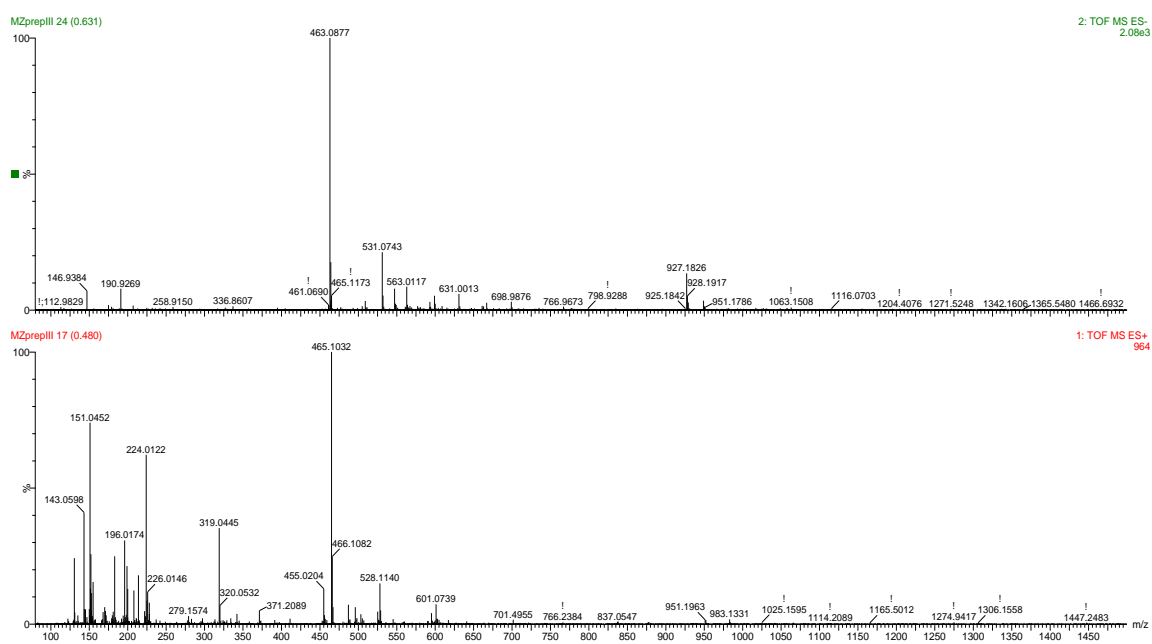
Anexo 9: Espectro expandido de RMN ^1H - ^{13}C HSQC (500 MHz, CD_3CD) do composto **3**.

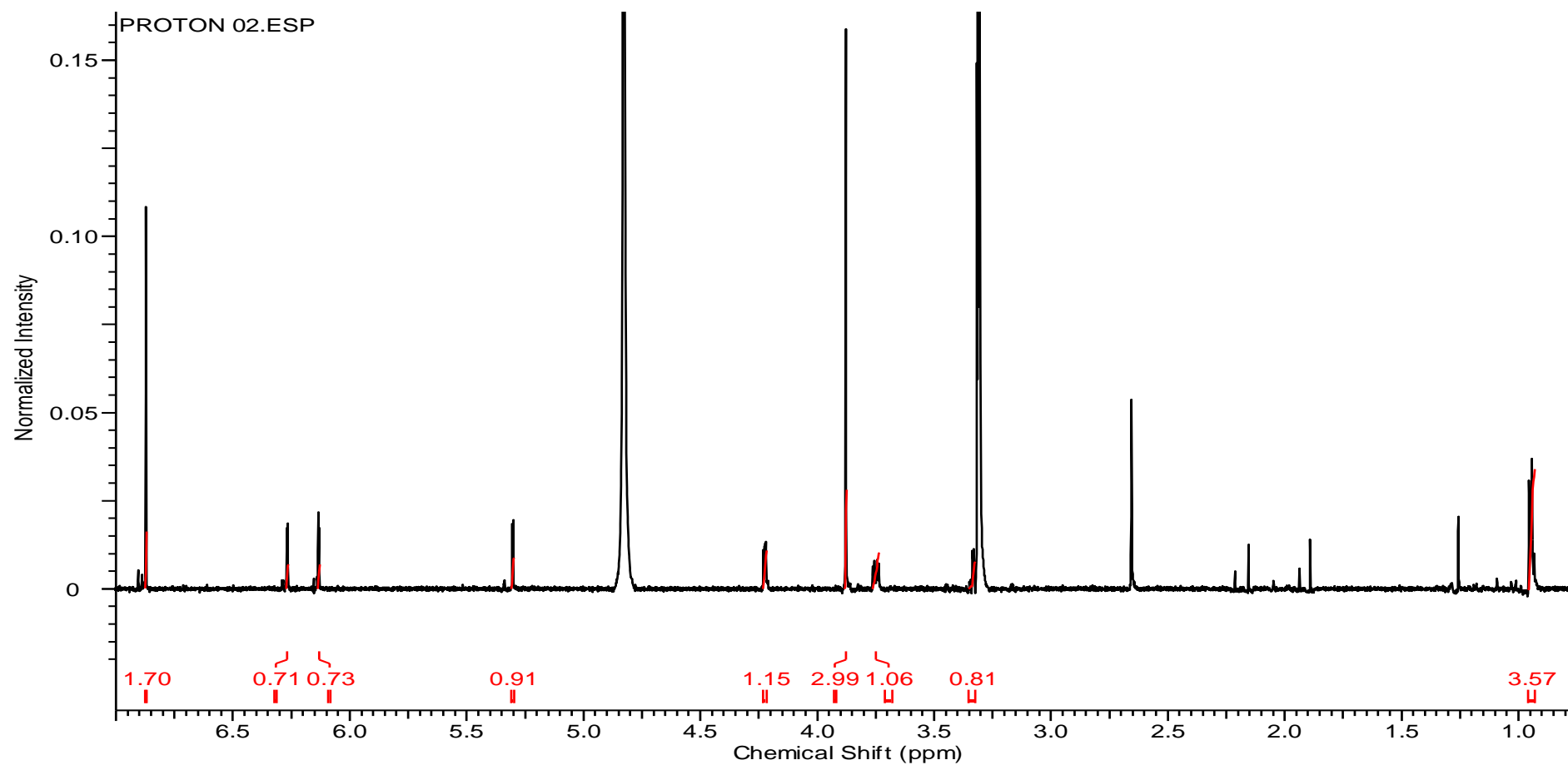


Anexo 10: Espectro expandido de RMN ^1H - ^{13}C HMBC (500 MHz, CD_3CD) do composto **3**.

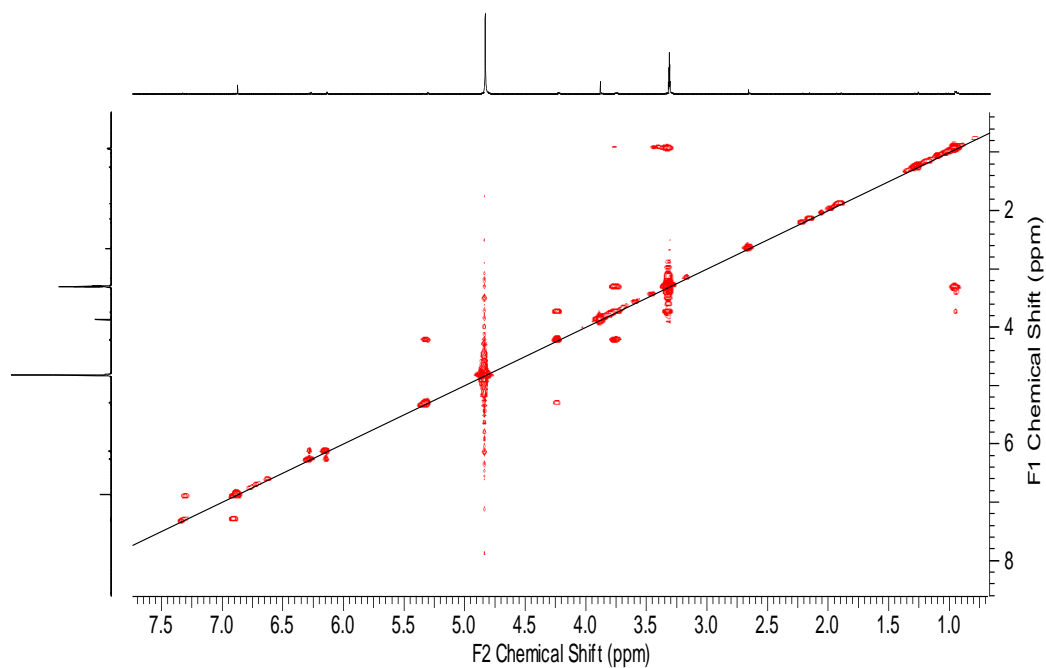


Anexo 11: Fragmentograma de HRESITOFMS em modo positivo e negativo correspondente ao composto **3**

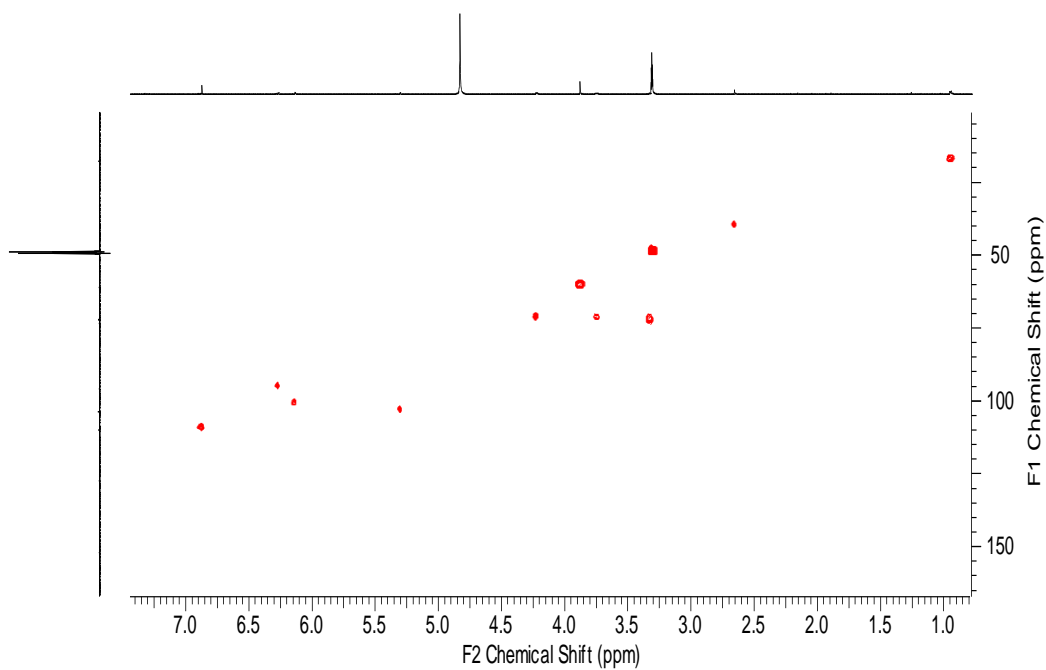


Anexo 12: Espectro expandido de RMN ^1H (500 MHz, CD_3CD) do composto **4**.

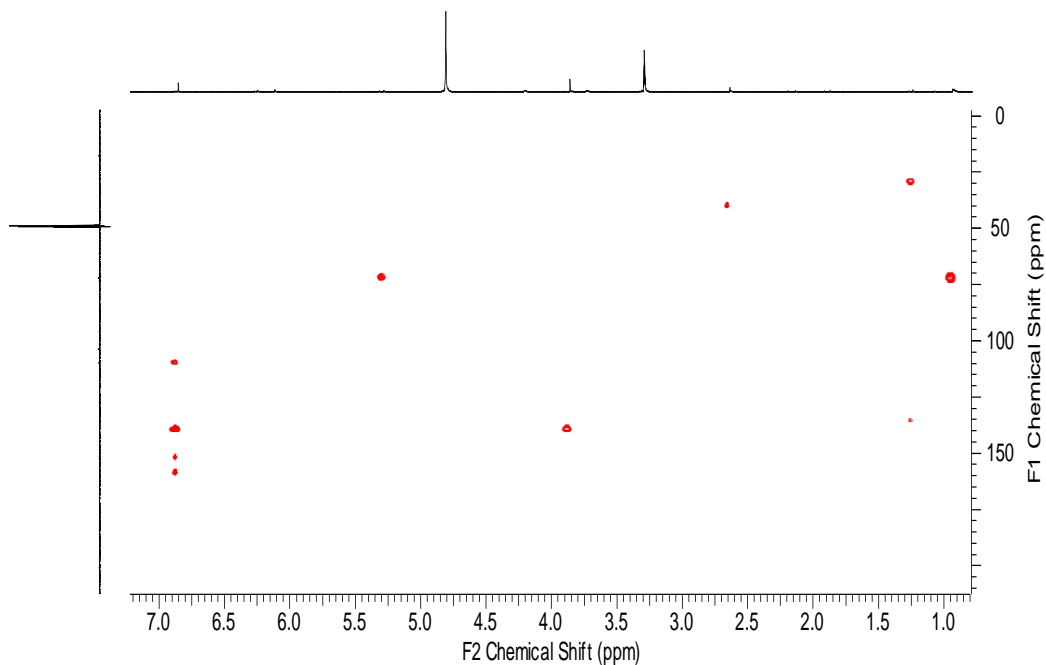
Anexo 13: Espectro expandido de RMN ^1H - ^1H COSY (500 MHz, CD_3CD) do composto 4.



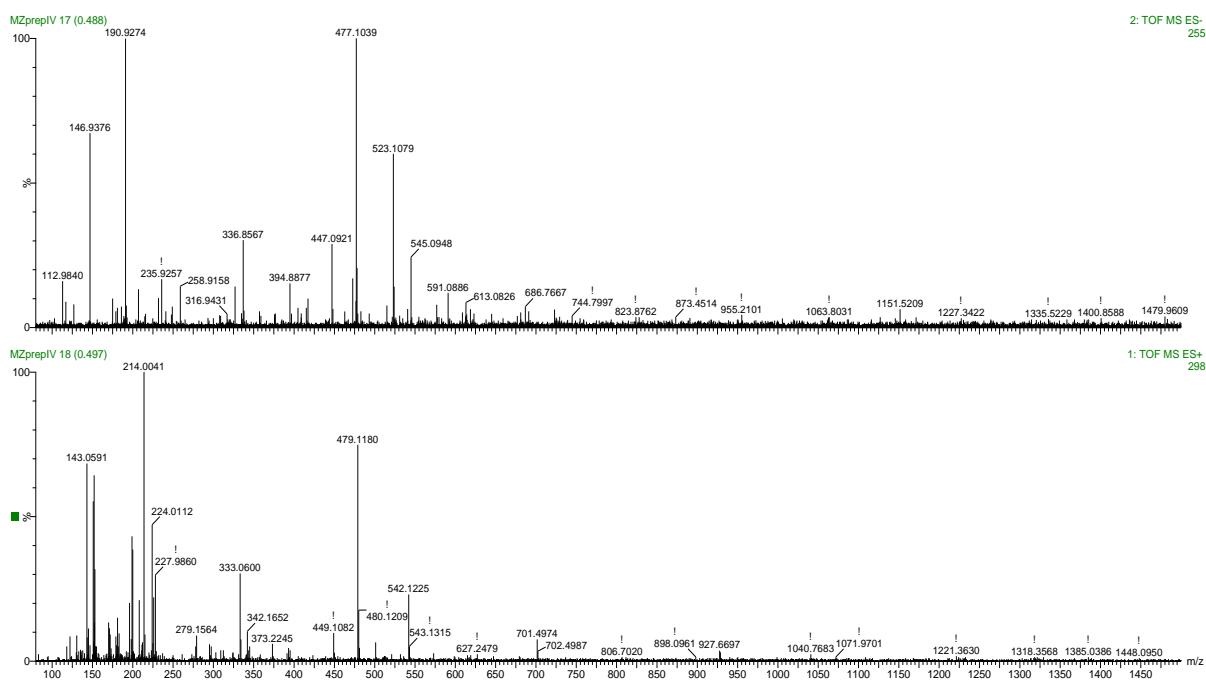
Anexo 14: Espectro expandido de RMN ^1H - ^{13}C HSQC (500 MHz, CD_3CD) do composto 4.



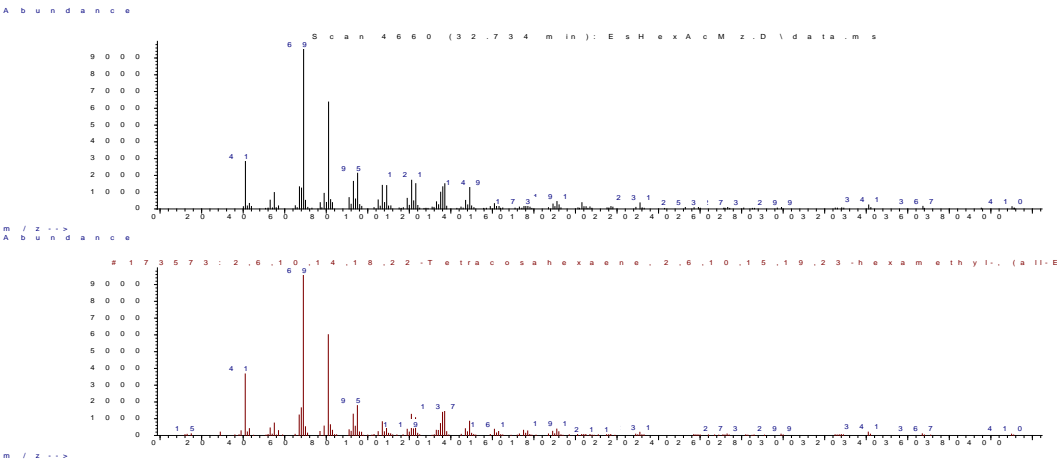
Anexo 15: Espectro expandido de RMN ^1H - ^{13}C HMBC (500 MHz, CD_3CD) do composto **4**.



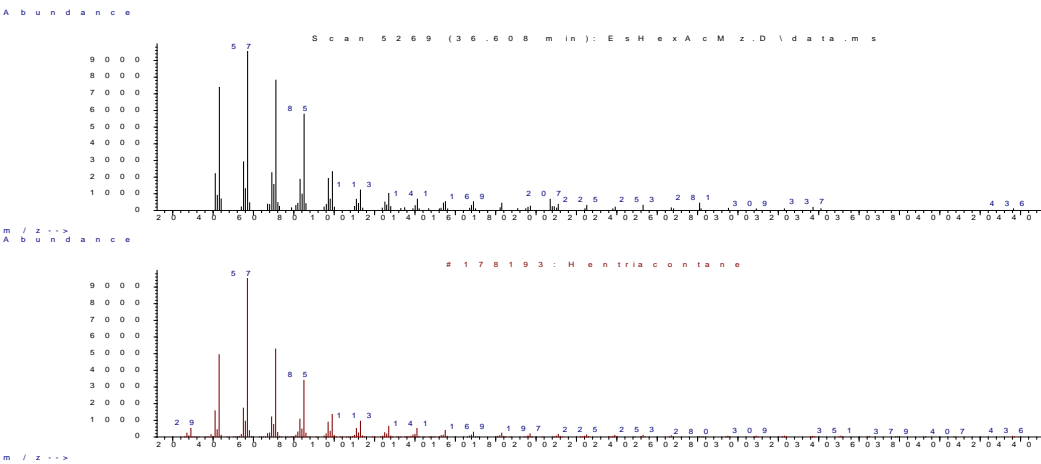
Anexo 16: Fragmentograma HRESITOFMS em modo positivo e negativo correspondente ao composto **4**.



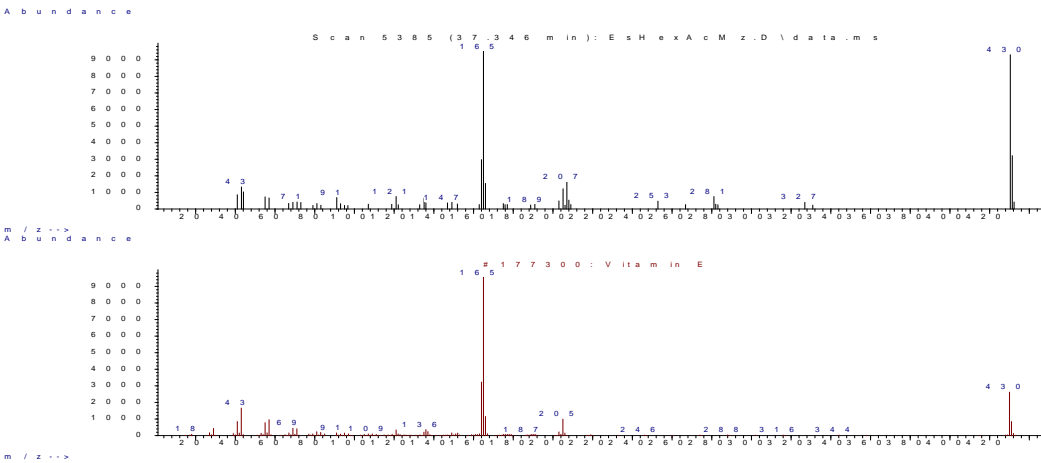
Anexo 17: Fragmentograma do composto A.



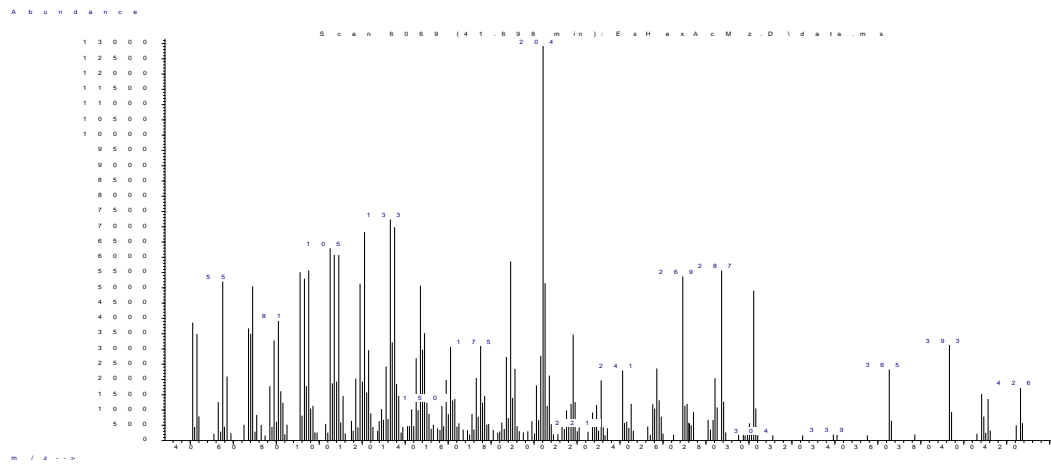
Anexo 18: Fragmentograma do composto B.



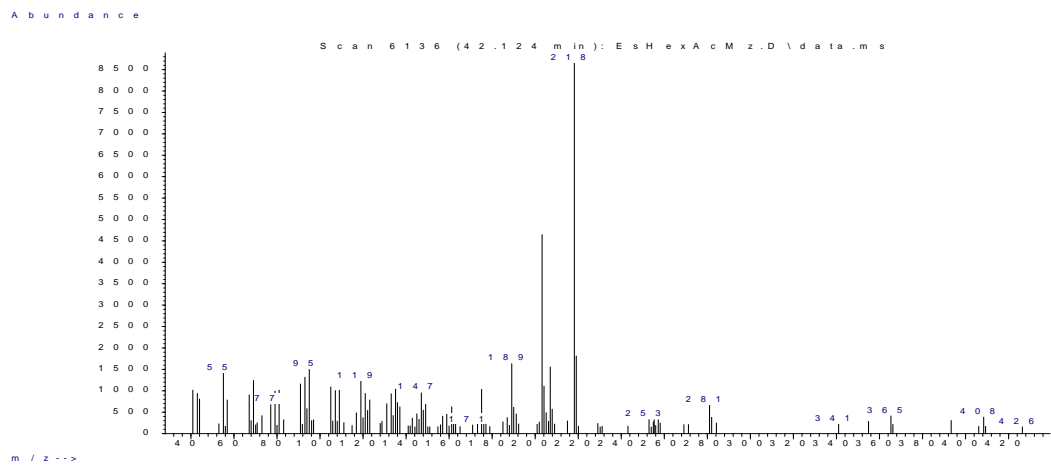
Anexo 19: Fragmentograma do composto C.



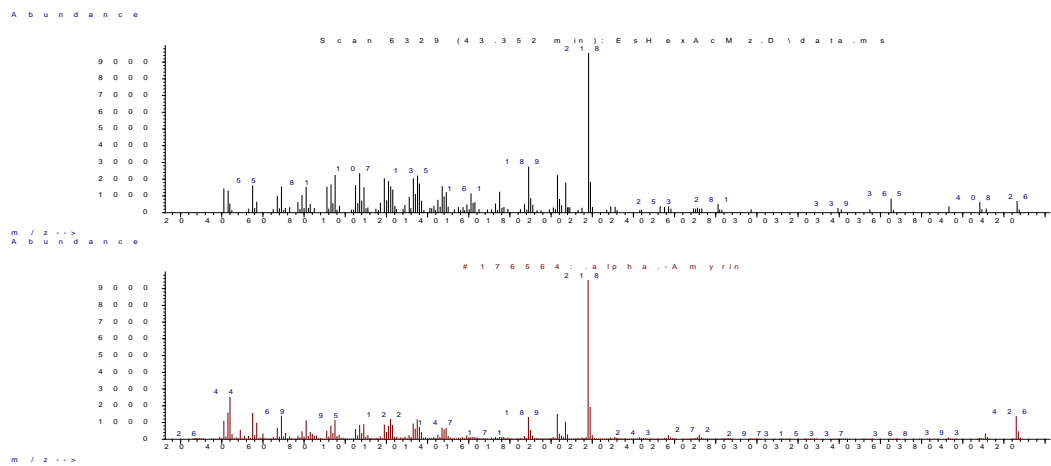
Anexo 20: Fragmentograma do composto 5.

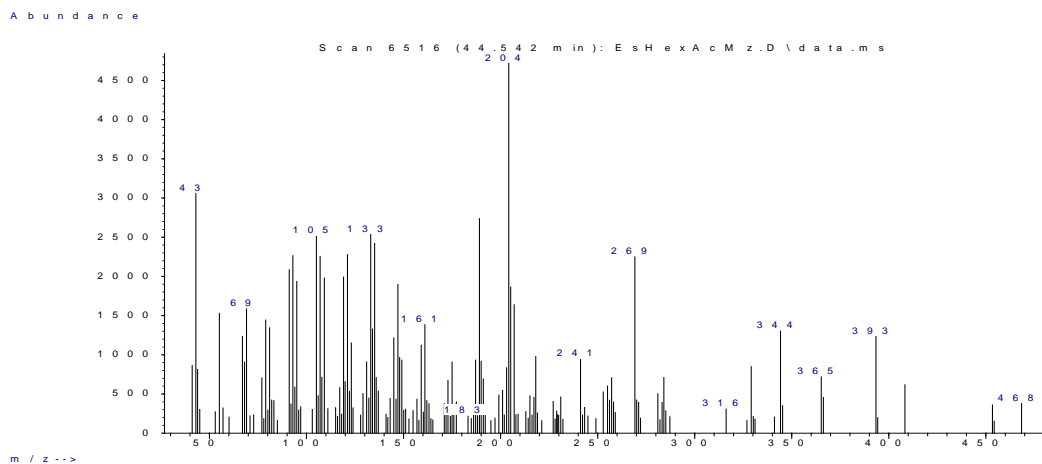
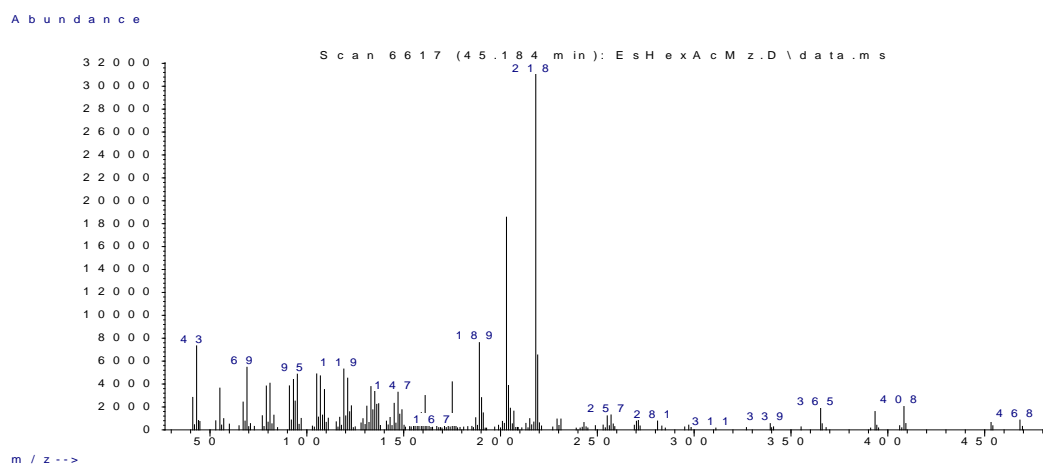
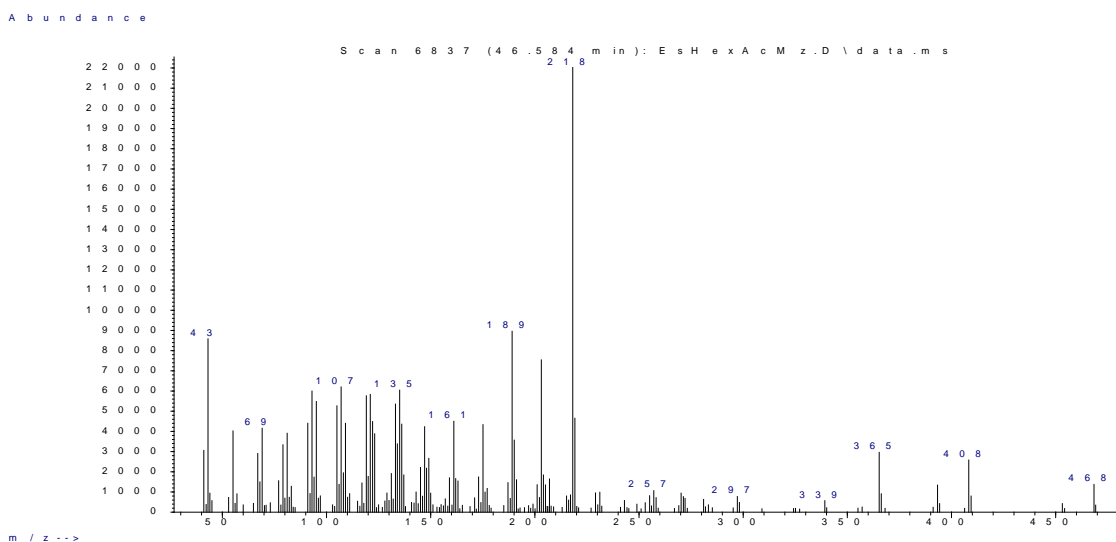


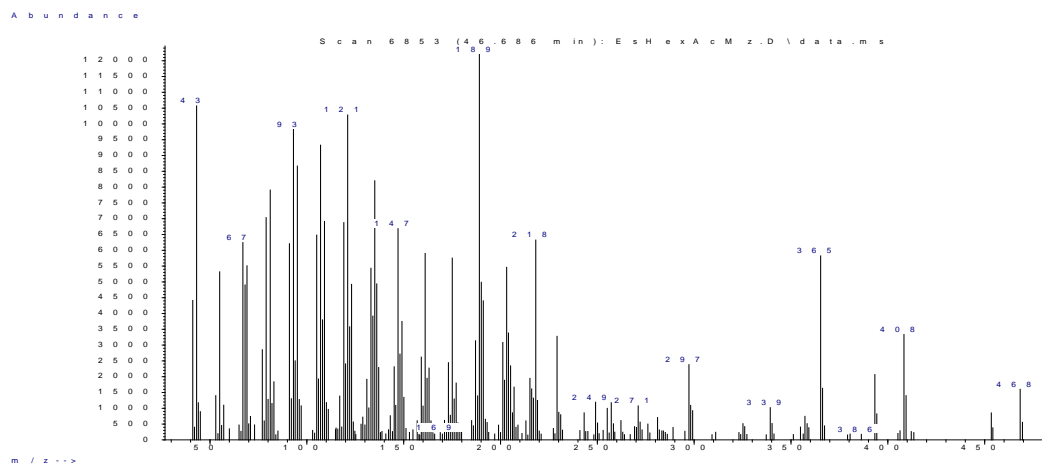
Anexo 21: Fragmentograma do composto 6.



Anexo 22: Fragmentograma do composto 7

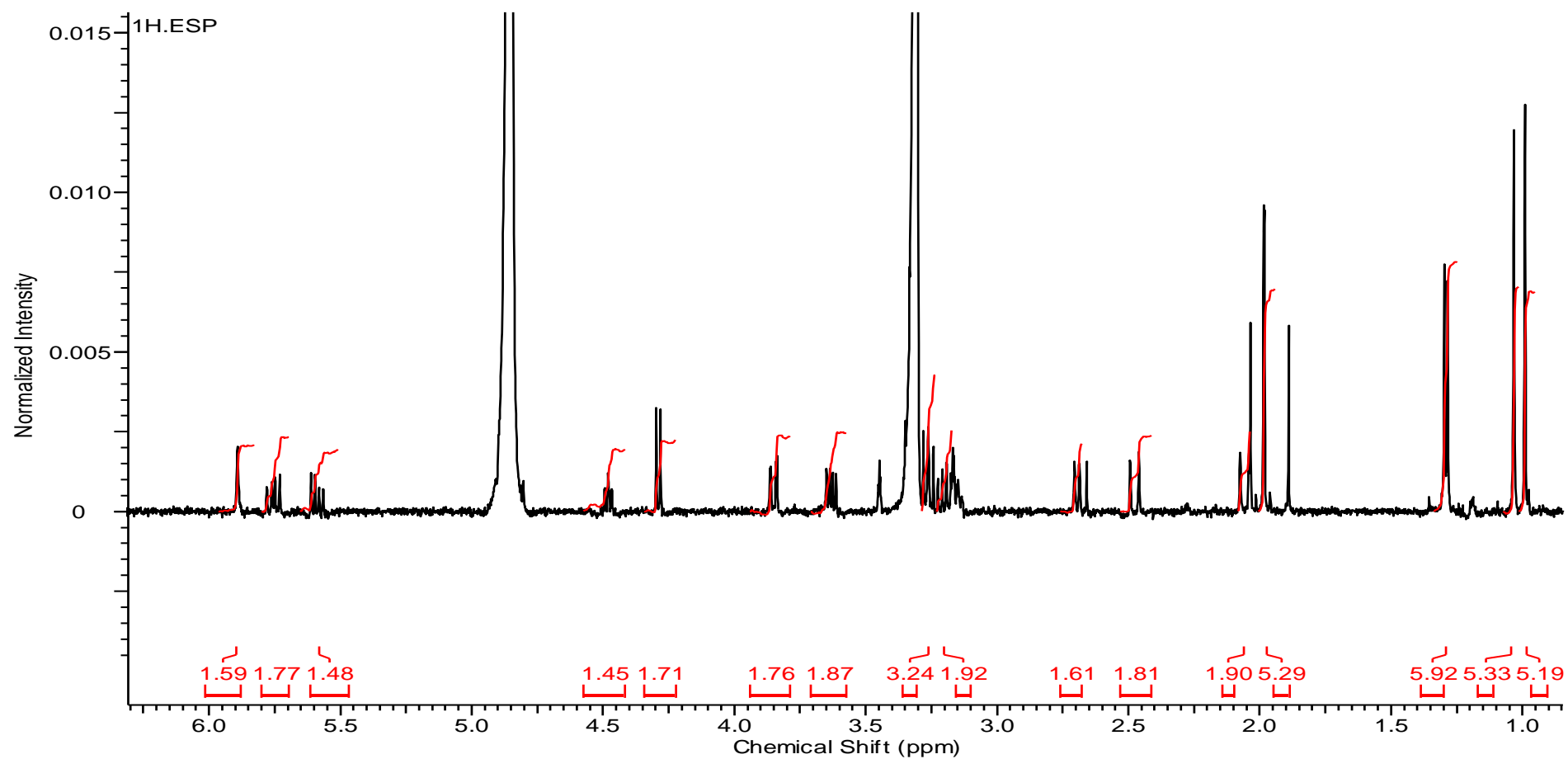


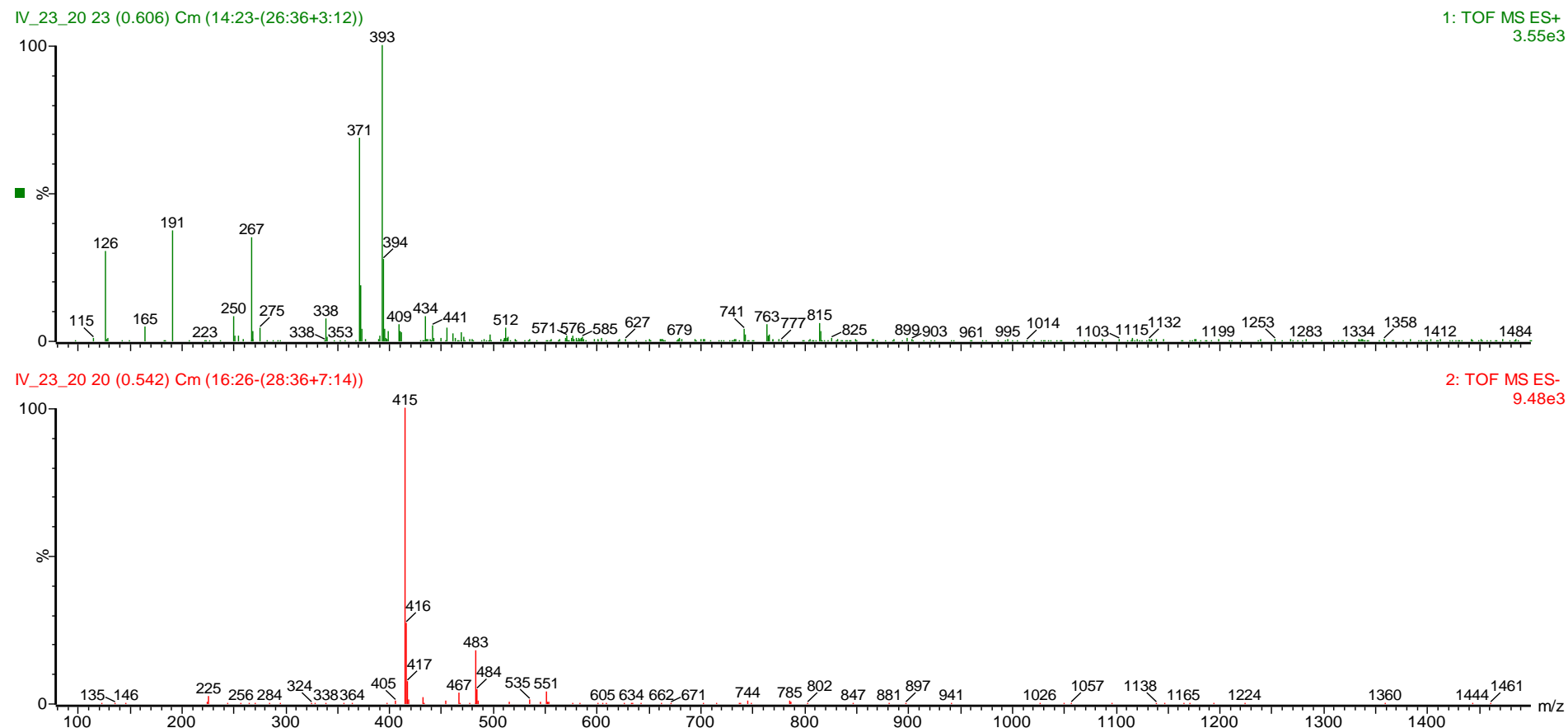
Anexo 23: Fragmentograma do composto 8.**Anexo 24: Fragmentograma do composto 9.****Anexo 25: Fragmentograma do composto 10.**

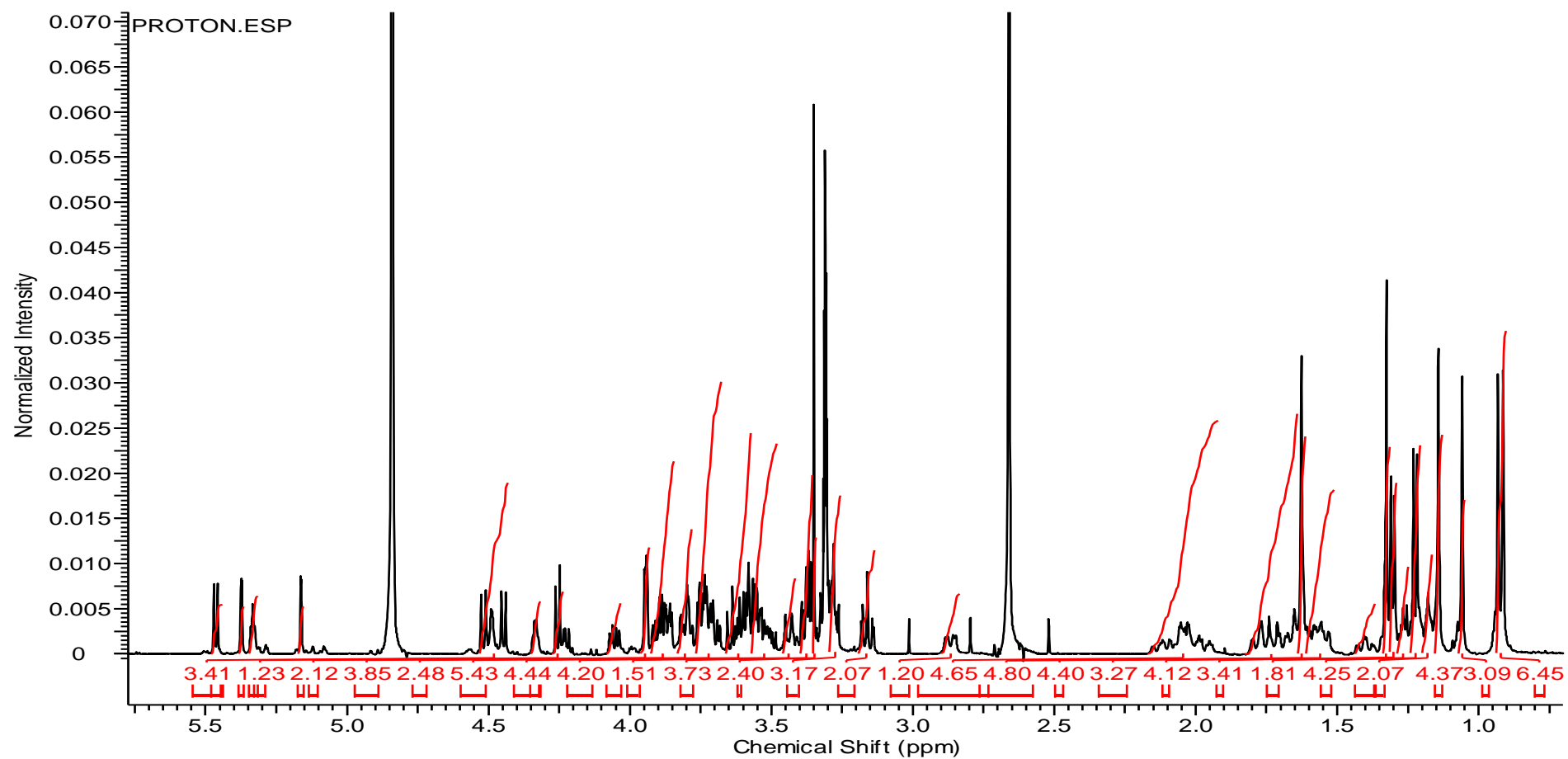
Anexo 26: Fragmentograma do composto 11.

Anexos correspondentes às análises realizadas com a espécie *M. commersonii*

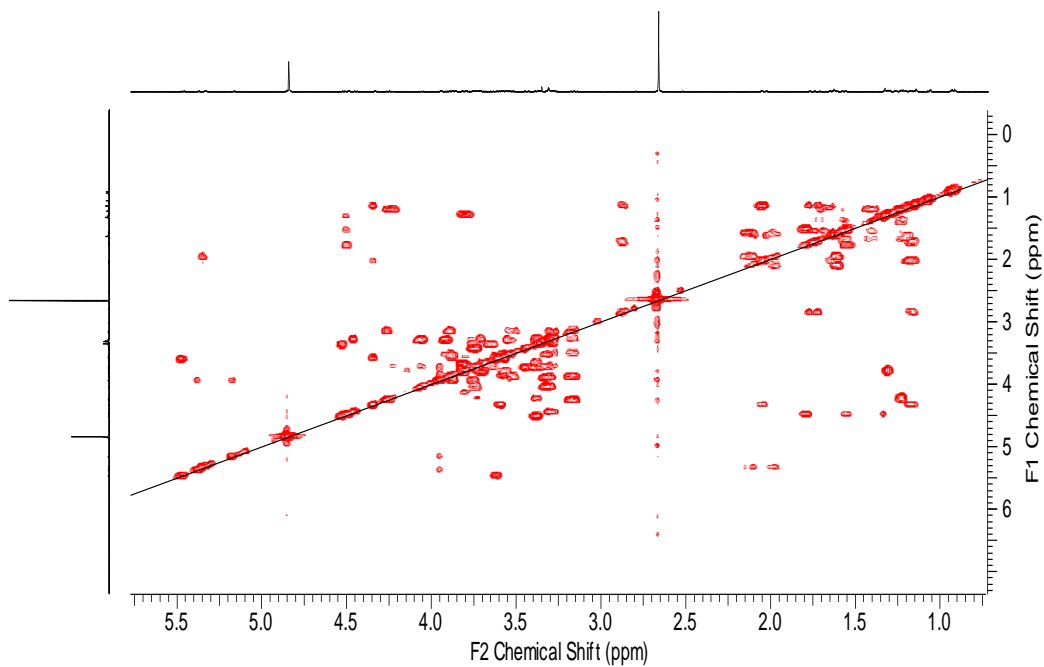
Anexo 27: Espectro expandido de RMN ^1H (500 MHz, CD_3CD) do composto **1'**



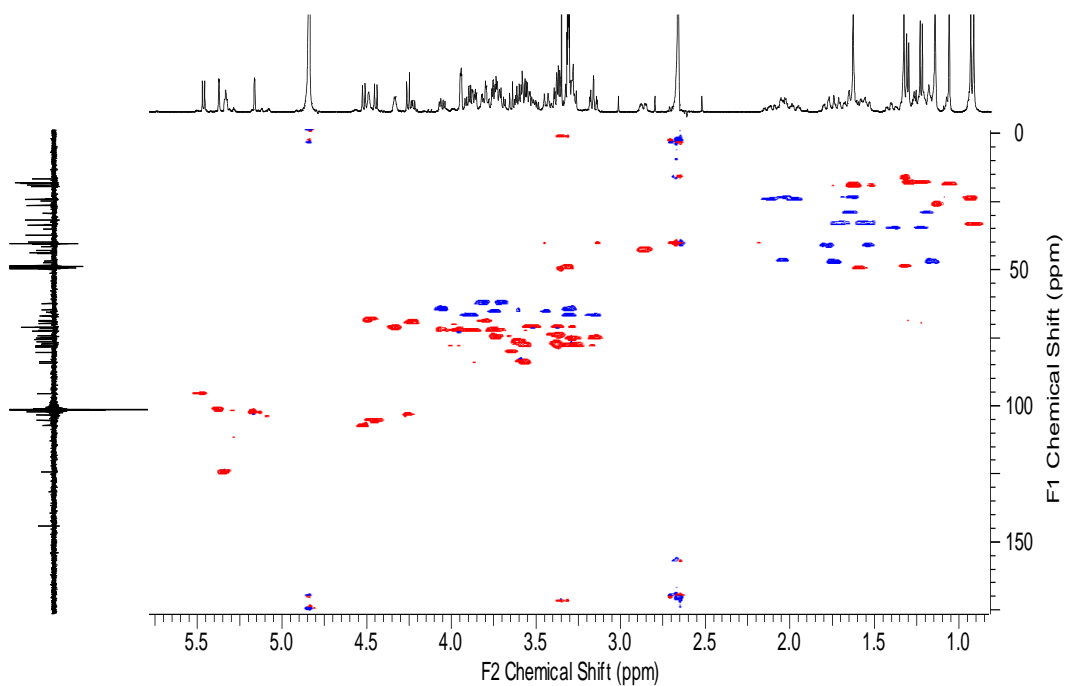
Anexo 28: Fragmentograma HRESITOFMS em modo positivo e negativo correspondente ao composto 1'.

Anexo 29: Espectro expandido de RMN ^1H (500 MHz, CD_3CD) do composto **2'**.

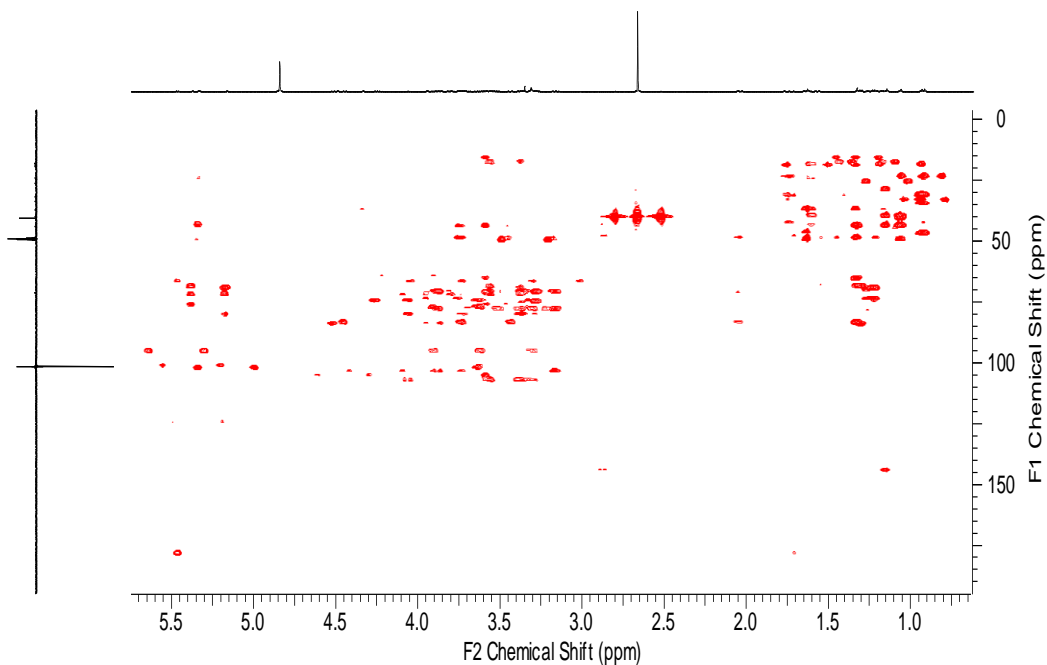
Anexo 30: Espectro expandido de RMN COSY ^1H - ^1H -(500 MHz, CD_3CD) do composto **2'**.



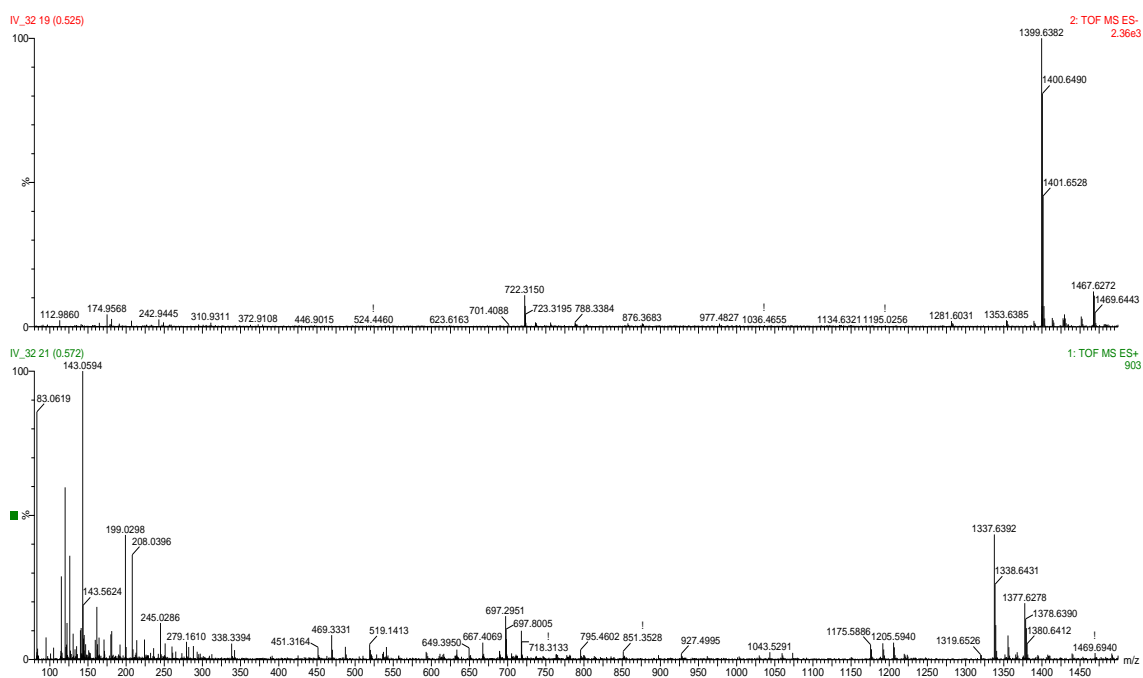
Anexo 31: Espectro expandido de RMN HSQC ^1H - ^{13}C -(500 MHz, CD_3CD) do composto **2'**.



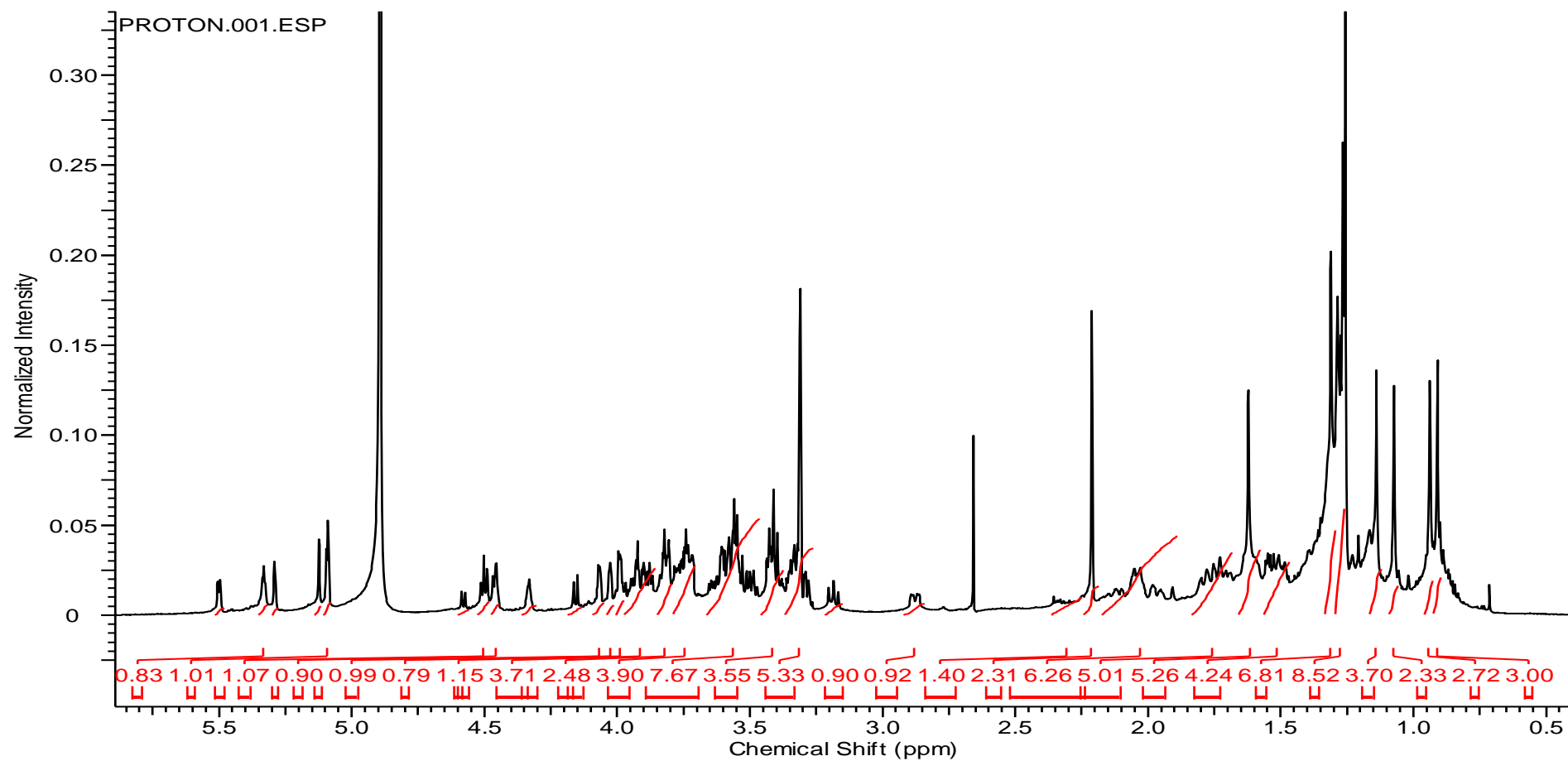
Anexo 32: Espectro expandido de RMN HMBC ^1H - ^{13}C -(500 MHz, CD_3CD) do composto **2'**.



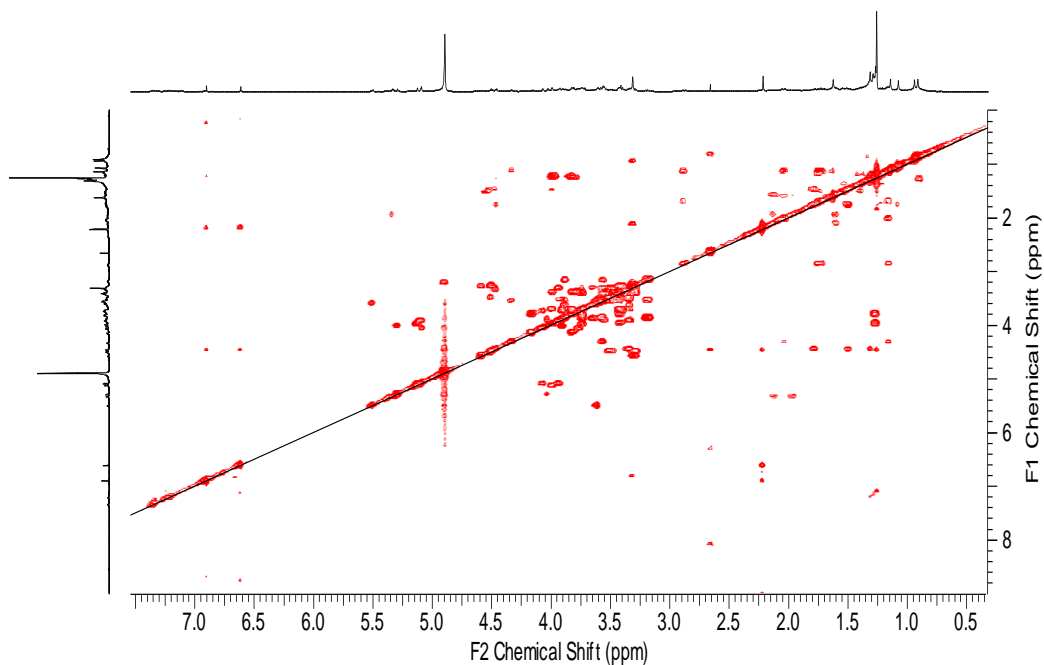
Anexo 33: Fragmentograma HRESITOFMS em modo positivo e negativo correspondente ao composto **2'**.



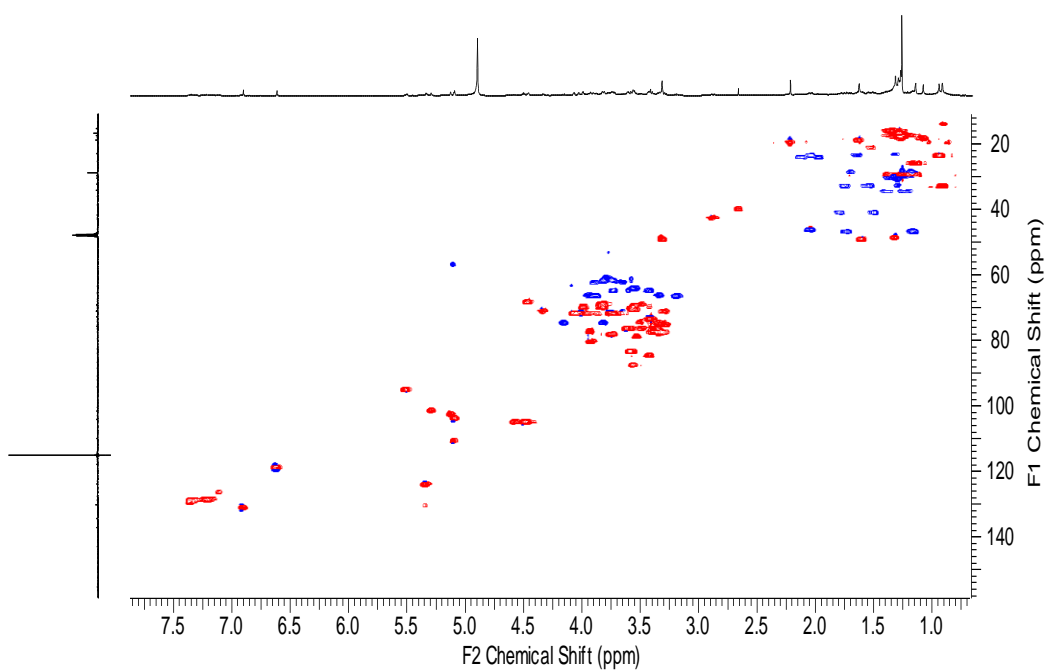
Anexo 34: Espectro expandido de RMN ^1H (500 MHz, CD_3CD) do composto **3'**.



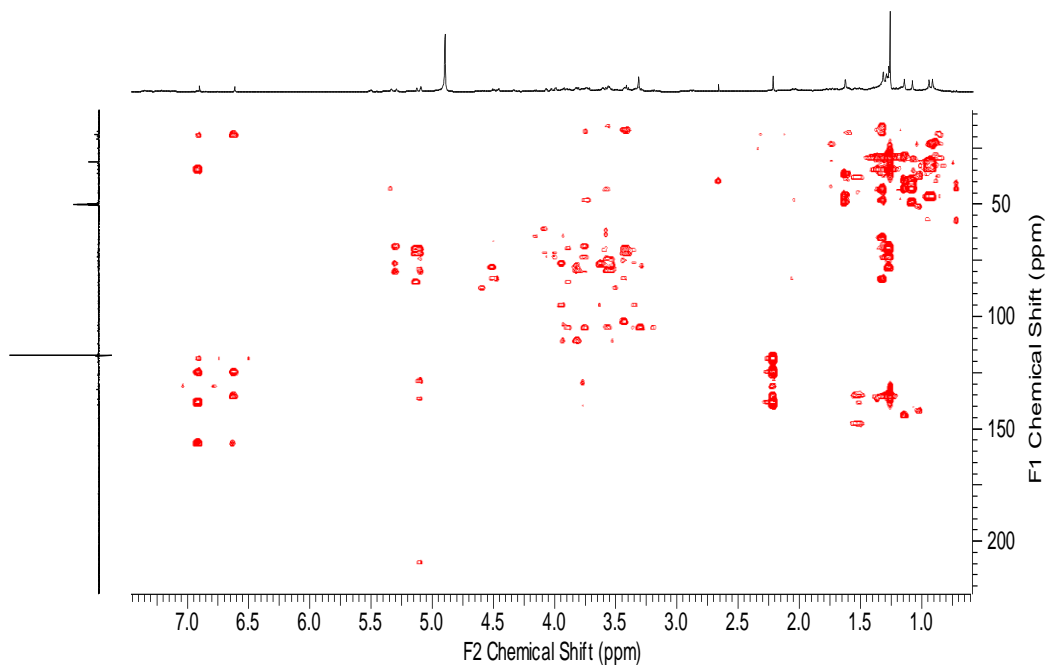
Anexo 35: Espectro expandido de RMN COSY ^1H - ^1H -(500 MHz, CD_3CD) do composto **3'**.



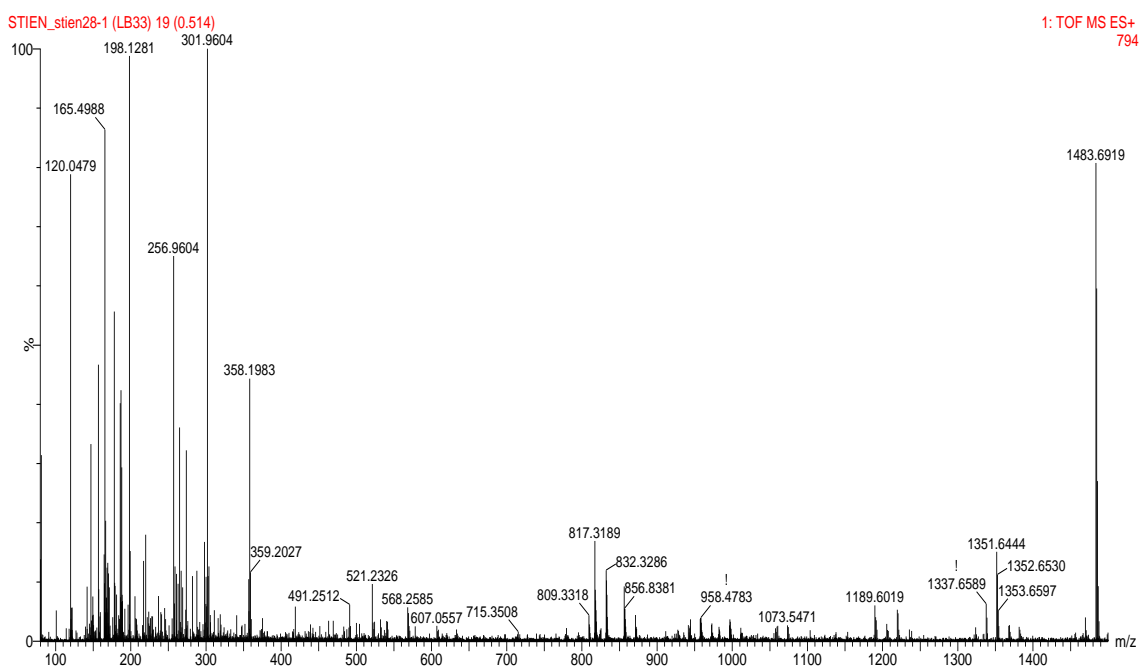
Anexo 36: Espectro expandido de RMN HSQC ^1H - ^{13}C -(500 MHz, CD_3CD) do composto **3'**.



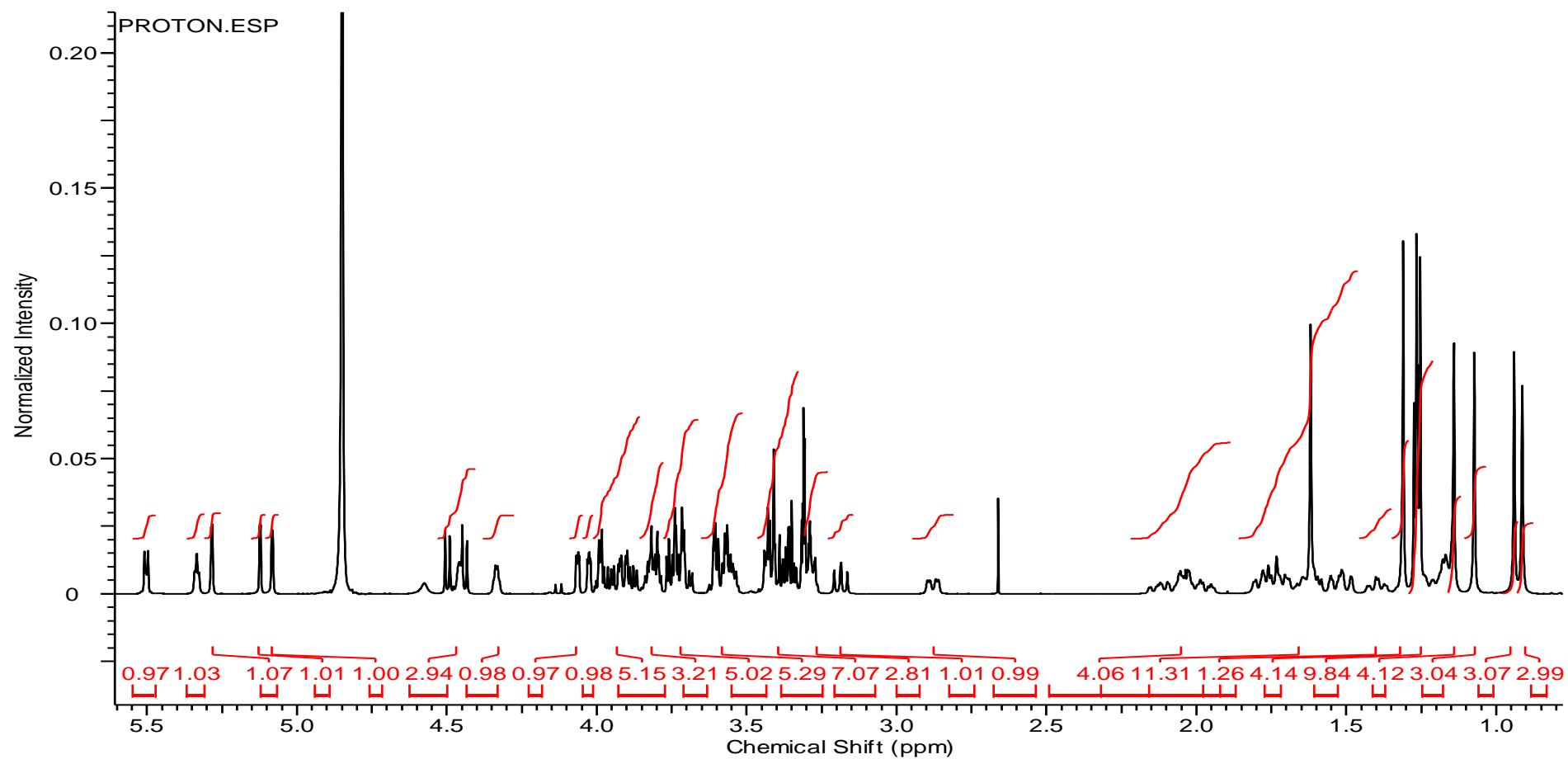
Anexo 37: Espectro expandido de RMN HMBC ^1H - ^{13}C -(500 MHz, CD_3CD) do composto **3'**.



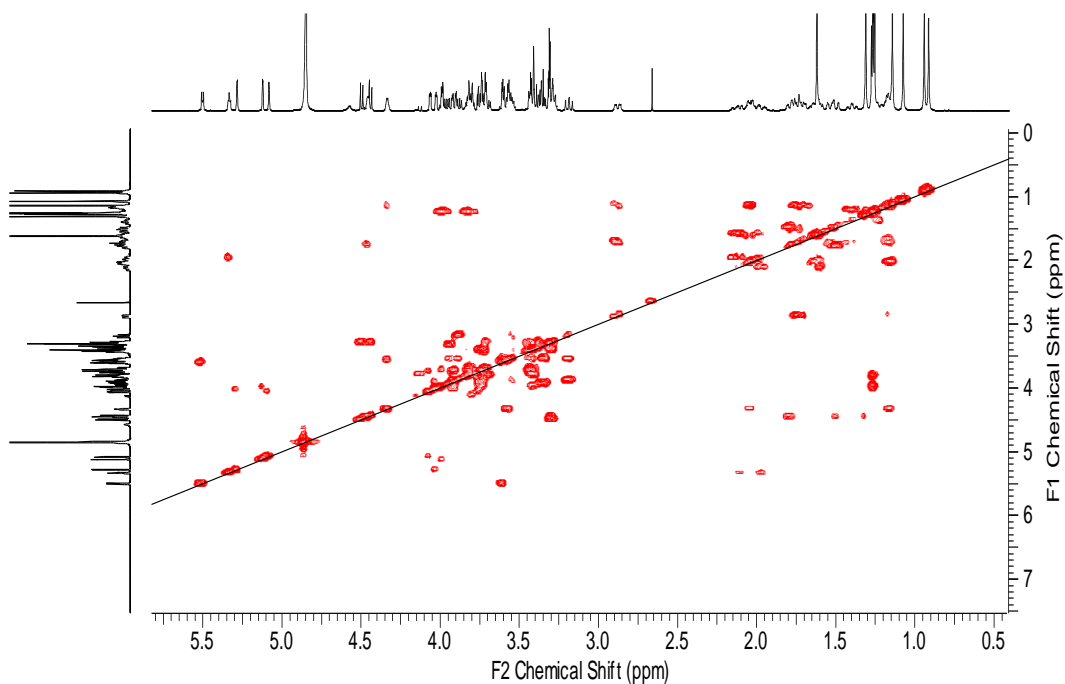
Anexo 38: Fragmentograma HRESITOFMS em modo positivo correspondente ao composto **3'**.



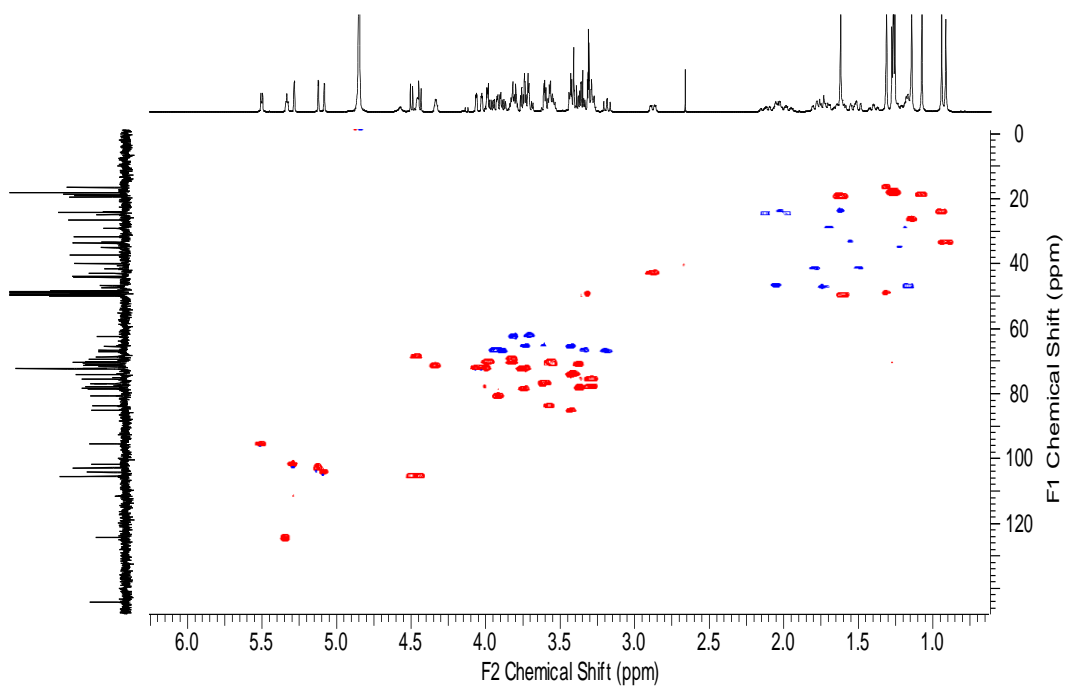
Anexo 39: Espectro expandido de RMN ^1H (500 MHz, CD_3CD) do composto **4'**.



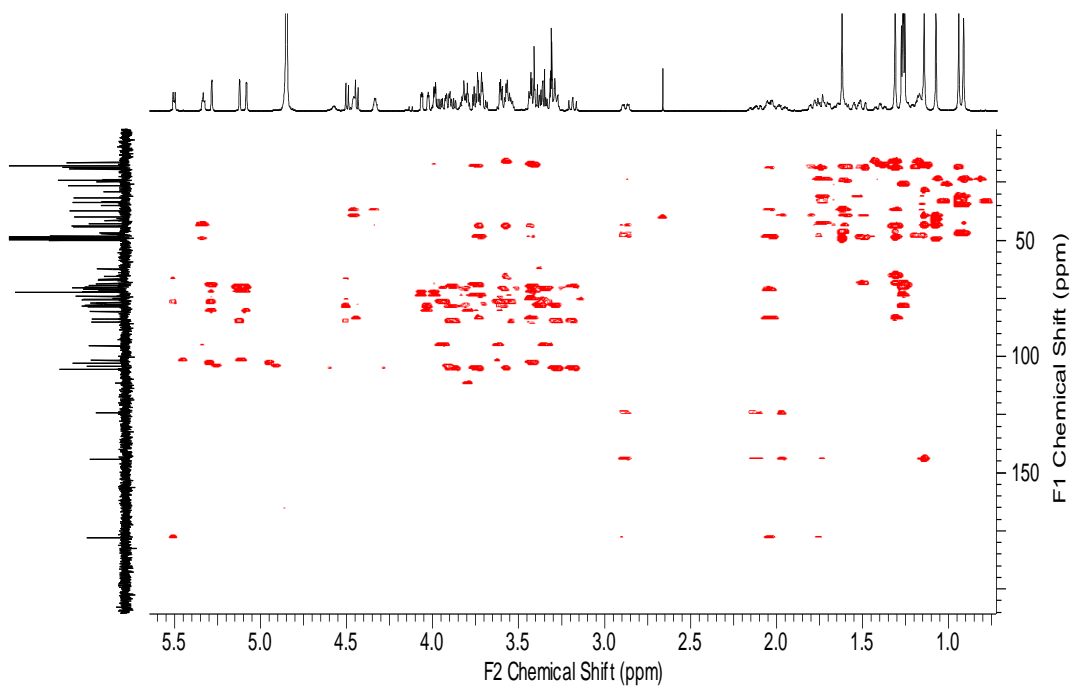
Anexo 40: Espectro expandido de RMN COSY ^1H - ^1H -(500 MHz, CD_3CD) do composto **4'**



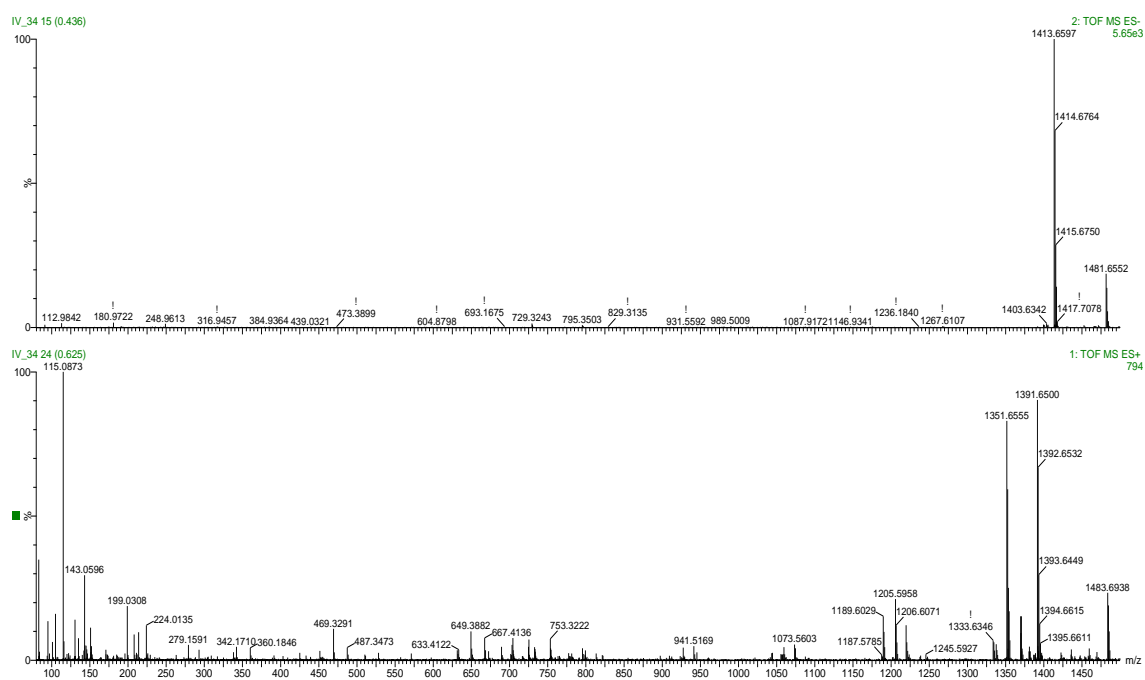
Anexo 41: Espectro expandido de RMN HSQC ^1H - ^{13}C -(500 MHz, CD_3CD) do composto **4'**.



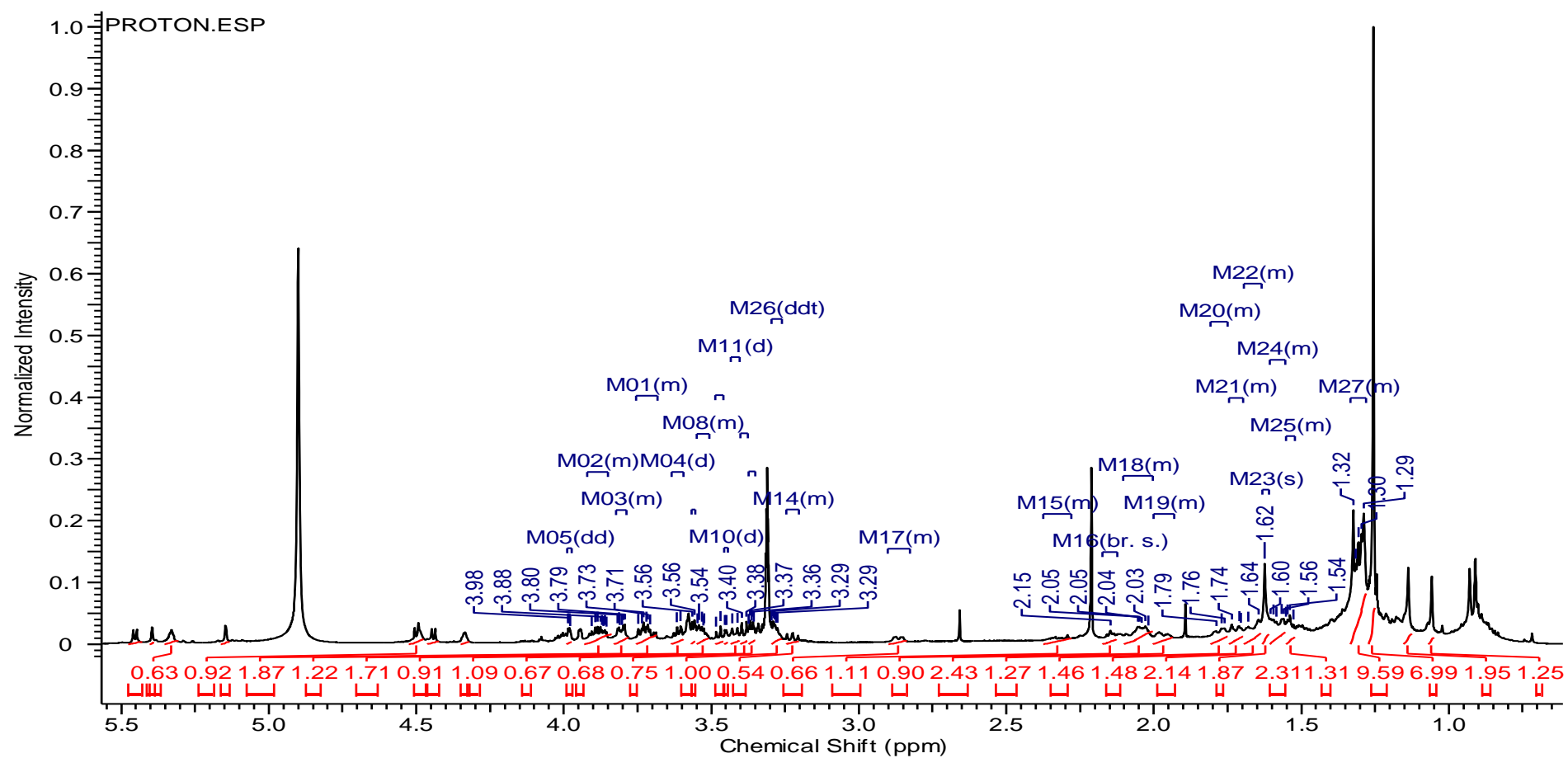
Anexo 42: Espectro expandido de RMN HMBC ^1H - ^{13}C -(500 MHz, CD_3CD) do composto **4'**.



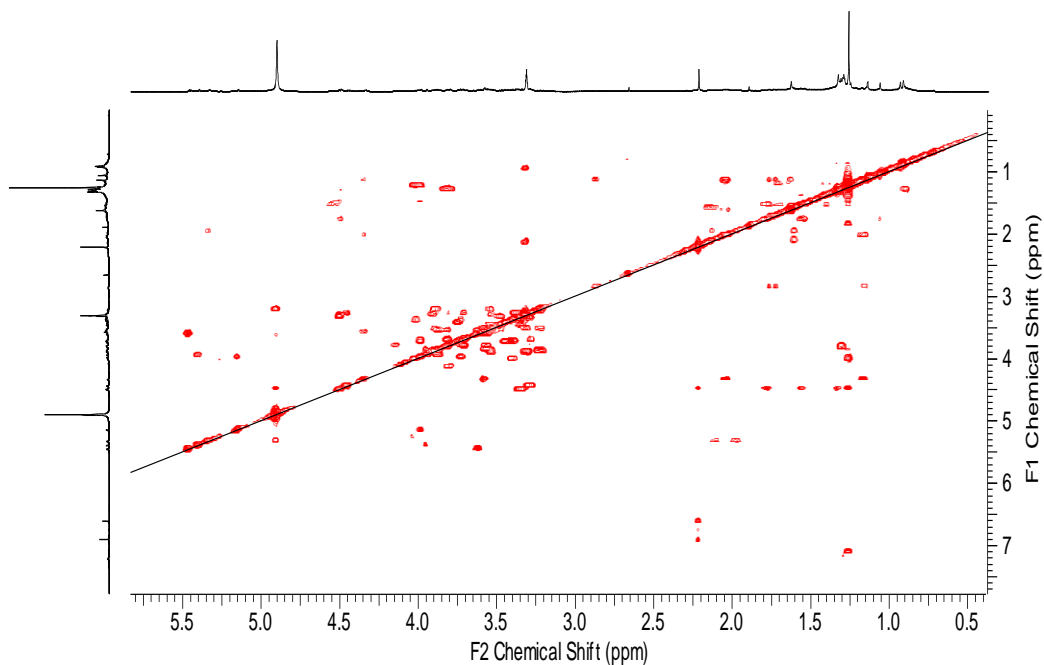
Anexo 43: Fragmentograma HRESITOFMS em modo positivo e negativo correspondente ao composto **4'**.



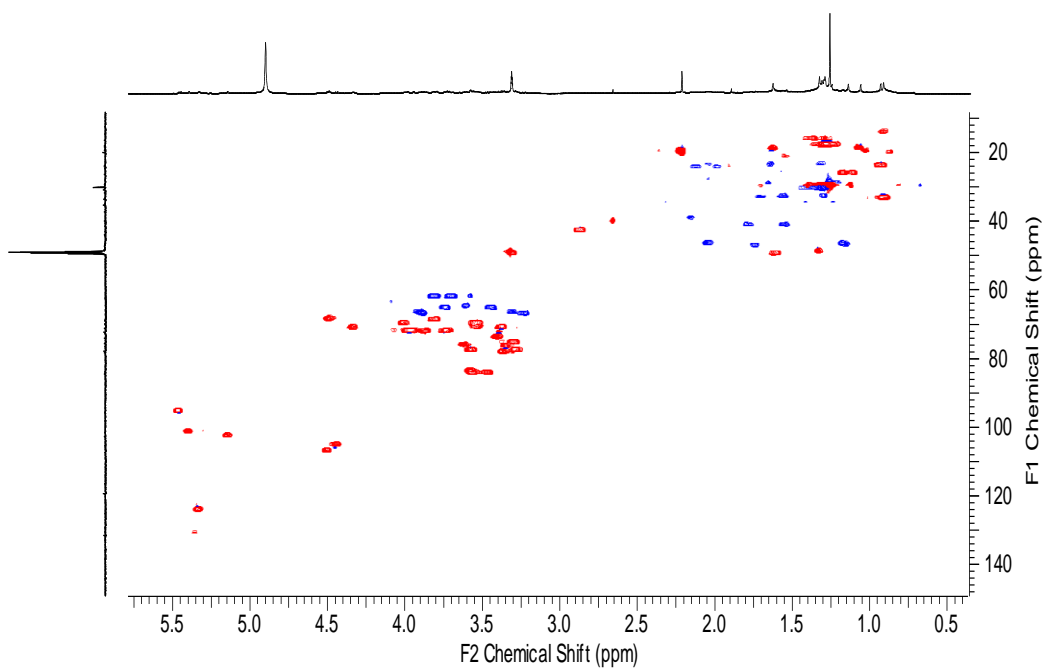
Anexo 44: Espectro expandido de RMN ^1H (500 MHz, CD_3CD) do composto **5'**.



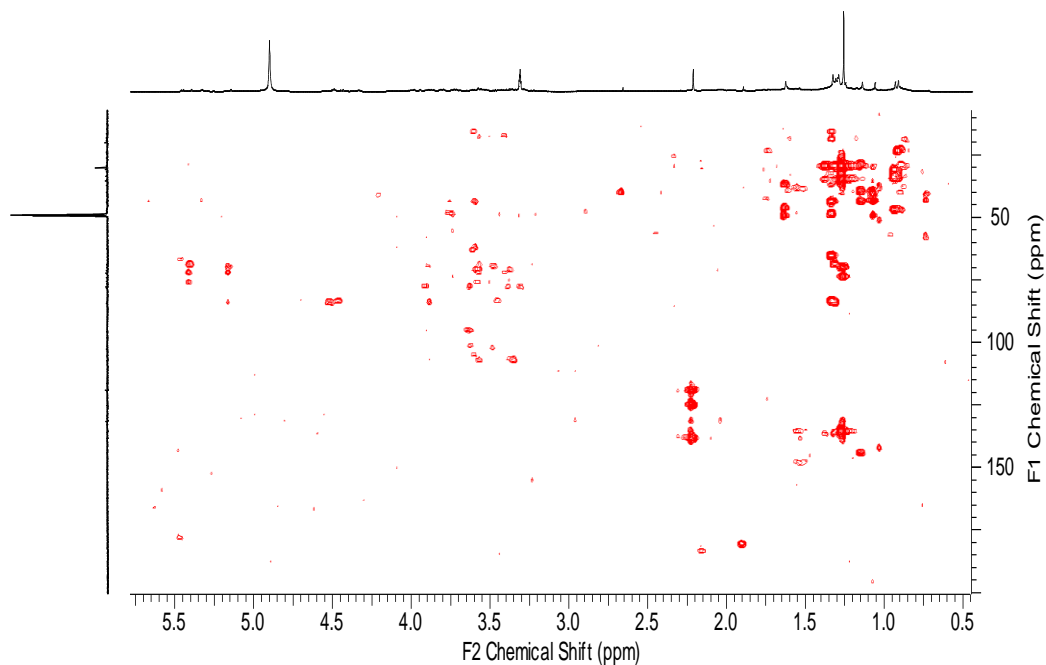
Anexo 45: Espectro expandido de RMN COSY ^1H - ^1H -(500 MHz, CD_3CD) do composto **5'**.



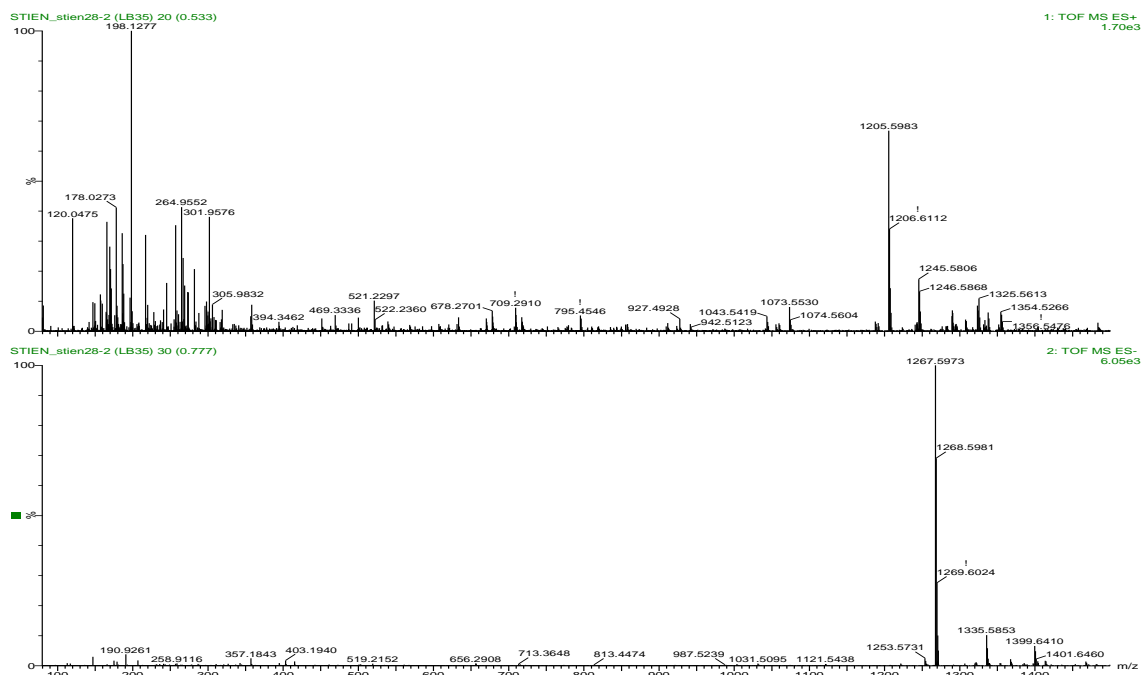
Anexo 46: Espectro expandido de RMN COSY ^1H - ^1H -(500 MHz, CD_3CD) do composto **5'**.

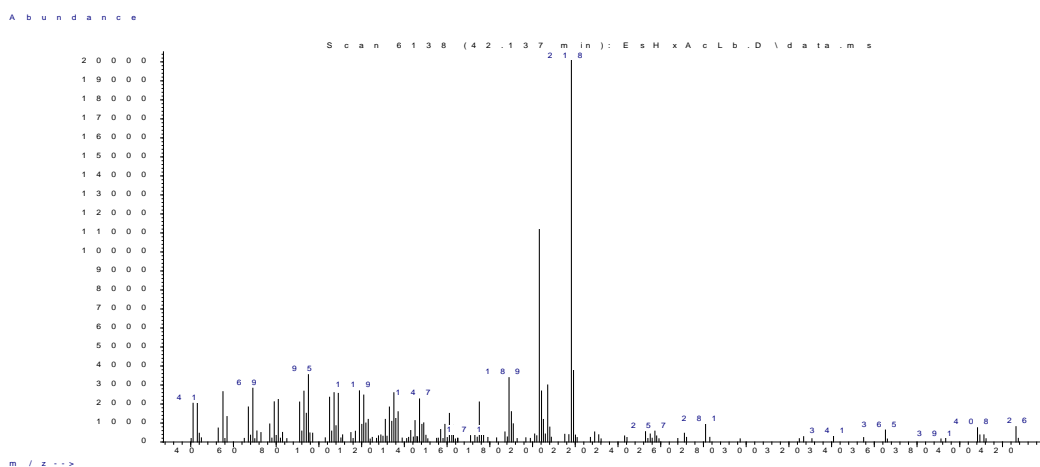
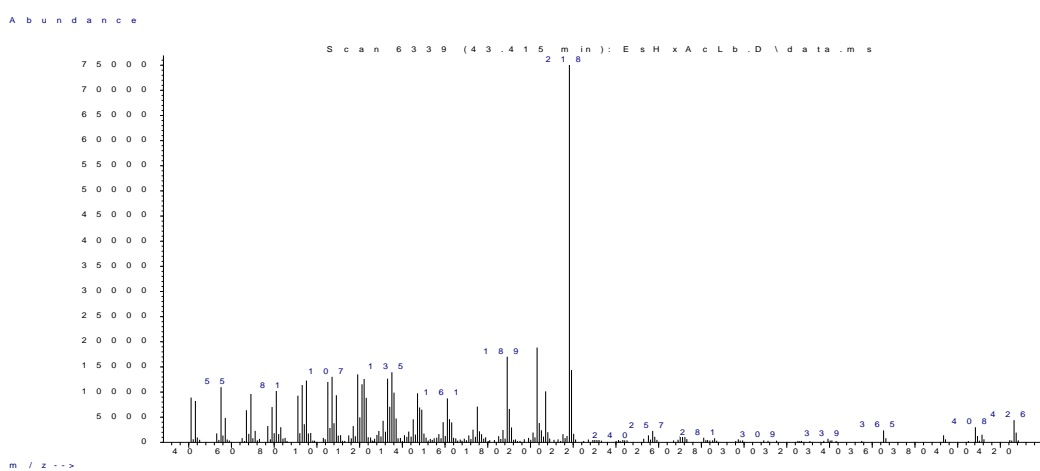
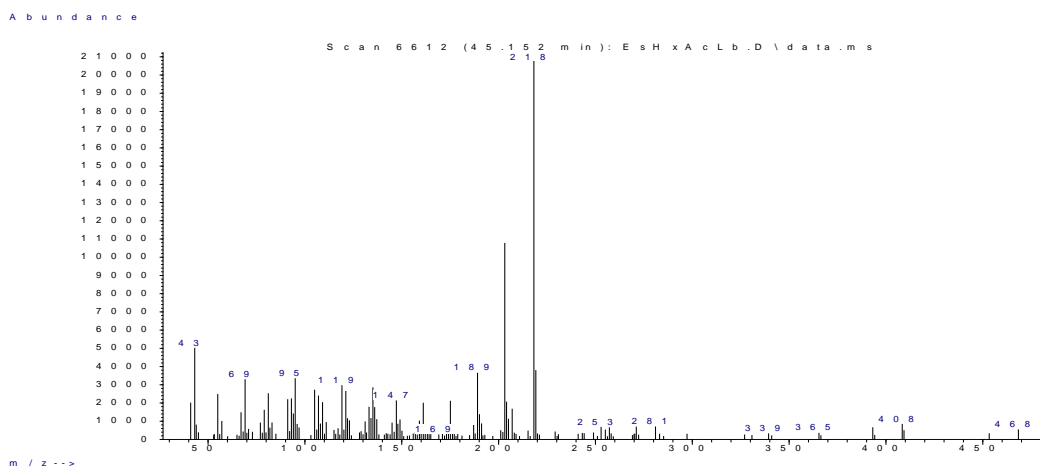


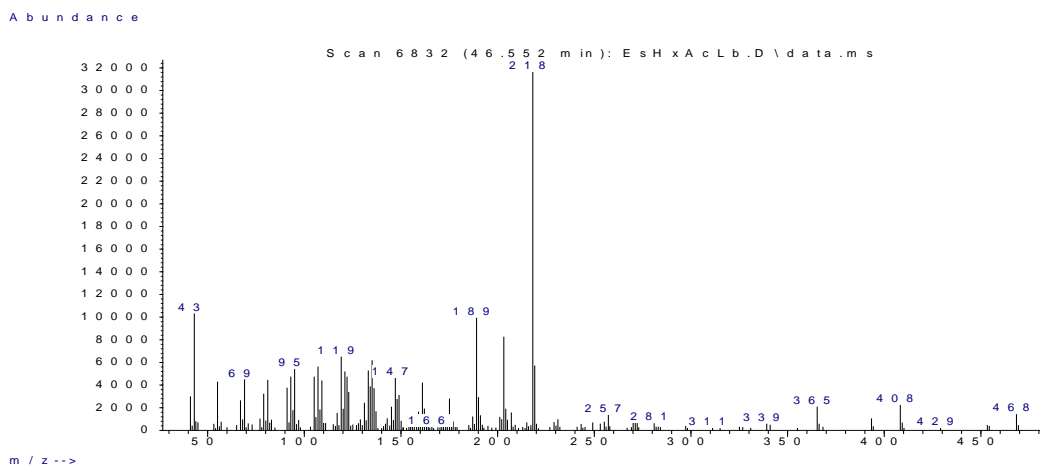
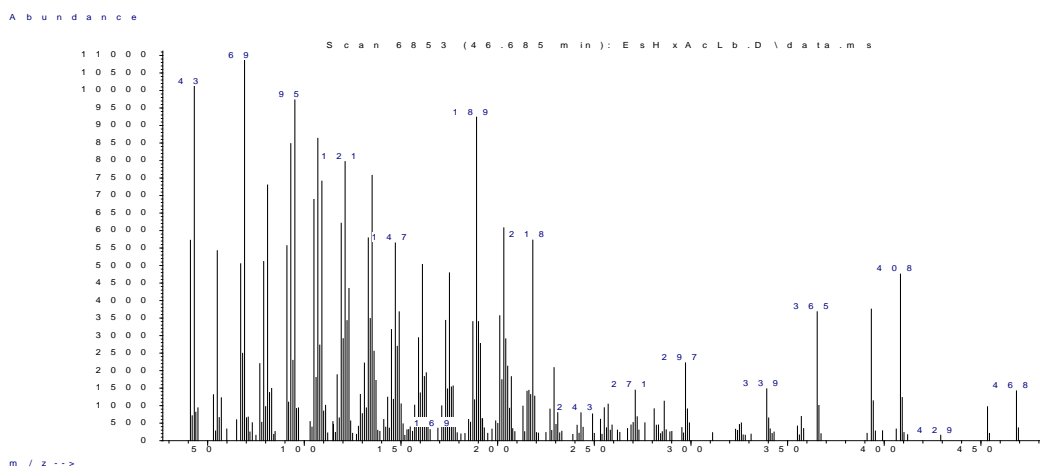
Anexo 47: Espectro expandido de RMN HSQC ^1H - ^{13}C (500 MHz, CD_3CD) do composto **5'**.



Anexo 48: Fragmentograma HRESITOFMS em modo positivo e negativo correspondente ao composto **5'**.



Anexo 49: Fragmentograma do composto 6'.**Anexo 50: Fragmentograma do composto 7'.****Anexo 51: Fragmentograma do composto 8'.**

Anexo 52: Fragmentograma do composto 9'.**Anexo 53: Fragmentograma do composto 10'.****Anexo 54: Fragmentograma do composto 11'.**